

N° d'enregistrement  
au CNRS  
A.O. 4526

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Mme LOMBARD - DES GOUTTES

Marie-Noëlle

Sujet de la Thèse : Développement de la gonade male chez le Rat  
et la Souris.  
Sa réponse à la fonction gonadotrope".

Soutenue le 27/10/1970 devant la Commission d'examen.

MM. L. GALLIEN      *Président.*

J. BENOIT  
E. WOLFF  
A. COLLENOT      } *Examineurs.*



N° d'enregistrement

au CNRS

A.O. 4526

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

PAR

Mme LOMBARD - DES GOUTTES

Marie-Noëlle

Sujet de la Thèse : "Développement de la gonade male chez le Rat  
et la Souris.  
Sa réponse à la fonction gonadotrope".

Soutenues le 27/10/1970 devant la Commission d'examen.

MM. L. GALLIEN      *Président.*

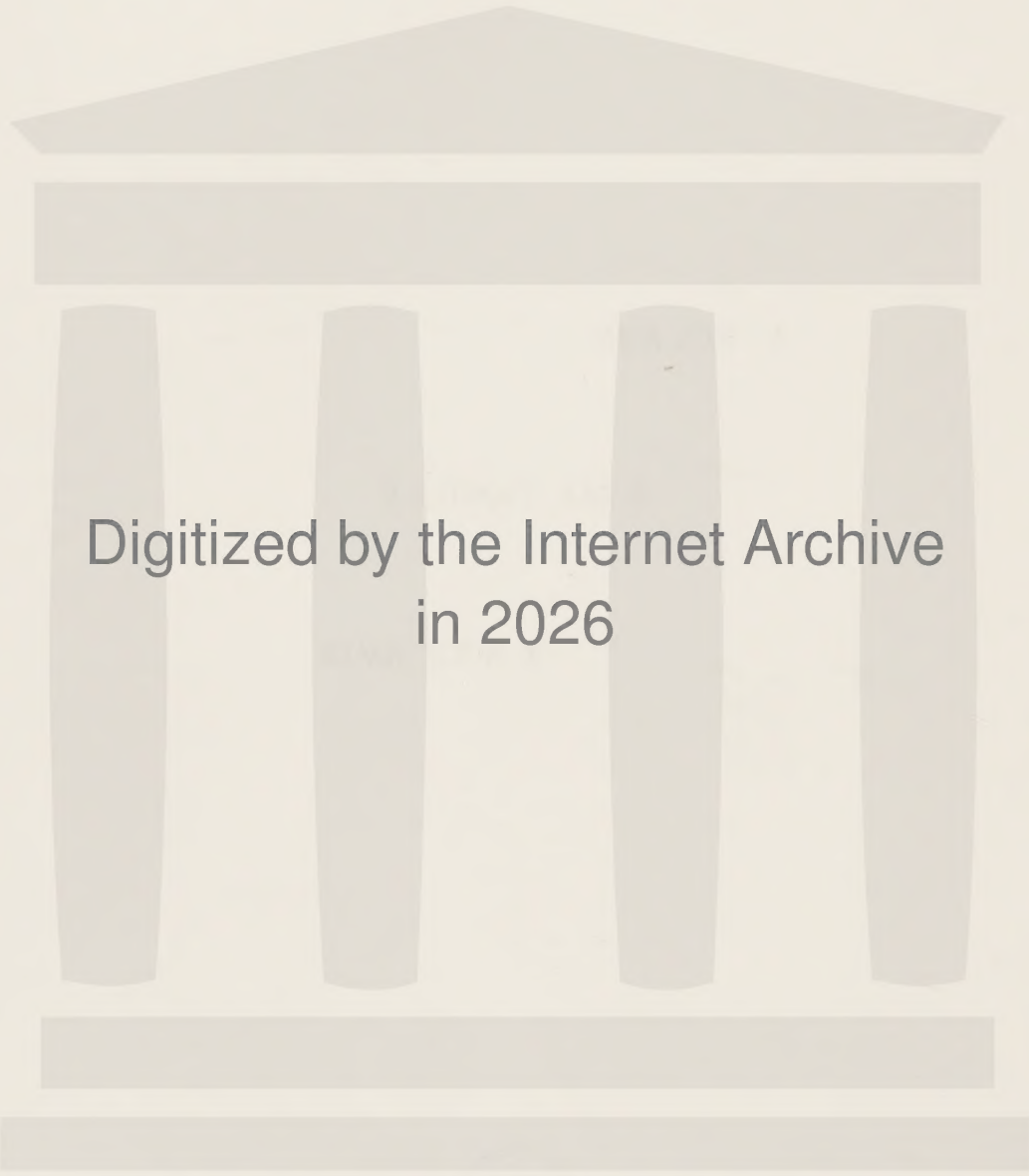
J. BENOIT  
E. WOLFF  
A. COLLENOT      } *Examineurs.*



A ROLAND

A MA FAMILLE

A MES AMIS



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551515\\_0004](https://archive.org/details/IA41551515_0004)

Je voudrais que Monsieur le Professeur Jacques BENOIT , Commandeur de la Légion d ' Honneur, Membre de l ' Académie nationale de Médecine, Professeur honoraire au Collège de France, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude pour la grande bienveillance avec laquelle il m'a accueillie dans son laboratoire. Au cours des neuf années de recherches qui ont abouti au présent travail, ses conseils, ses critiques et ses encouragements n'ont cessé d'être une aide précieuse et sûre.

Qu ' il me soit permis d'exprimer à Monsieur le Professeur Etienne WOLFF, Membre de l ' Institut, Administrateur du Collège de France, Directeur de l ' Institut d' Embryologie et de Tératologie expérimentales du C.N.R.S. , ma très vive reconnaissance pour la grande générosité avec laquelle il m'a accordé la possibilité de bénéficier des installations de ses services. C'est grâce à son obligeance, grâce au soutien scientifique, à l'appui moral et matériel que j'ai trouvé dans son laboratoire depuis plus d'un an, que j'ai pu mener à bien ce travail. Je suis heureuse de pouvoir lui témoigner ici toute ma respectueuse gratitude pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant de prendre part à mon Jury de thèse.

Je suis profondément reconnaissante à Monsieur le Professeur Louis GALLIEN , Membre de l ' Institut, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, de la grande bienveillance avec laquelle il a accepté la Présidence de mon Jury. C'est un grand honneur pour moi que de pouvoir l'en remercier ici très vivement.

Je voudrais également faire part de ma sincère gratitude à Monsieur le Professeur Alain COLLENOT de la Faculté des Sciences de Paris qui a bien voulu faire partie de mon Jury et m'accorder un échange de vues enrichissant pour l'interprétation de certains de mes résultats.

Madame Anne KAGAN - MOSZKOWSKA , Directeur de Recherches au C.N.R.S. , a guidé mes travaux avec sollicitude depuis mon initiation à la

recherche scientifique. Qu'elle trouve ici l'expression de ma vive et fidèle reconnaissance pour l'intérêt qu'elle a manifesté à l'égard de mes résultats, pour ses encouragements lorsque ces résultats ne répondaient pas à mes espoirs, et pour la grande confiance qu'elle m'a constamment témoignée.

C'est au Professeur Clifford GROBSTEIN , Chancelier de l' Université de Californie de San Diego , que je dois en grande partie l'élan inducteur qui a permis à mon travail de s'orienter vers sa forme définitive. Je tiens à lui témoigner ici mes sentiments de très respectueuse gratitude et de profonde admiration.

Je voudrais que Madame Denise SCHEIB - PFLEGER , Maître de Recherches au C. N. R. S. , trouve ici l'expression de toute ma reconnaissance pour l'accueil qu'elle m'a réservé dans le laboratoire du Professeur Etienne WOLFF. Grâce à elle j'ai été initiée aux techniques histoenzymologiques qui ont apporté un important complément à mon travail. J'ai trouvé en elle aide et soutien constants, alliés à une très précieuse et enrichissante collaboration.

J ' adresse à Monsieur le Professeur Claude ARON , Directeur de l ' Institut d' Histologie de la Faculté de Médecine de l' Université de Strasbourg, mes très vifs remerciements pour la bienveillante sollicitude avec laquelle il a suivi mon travail, pour la critique très soigneuse qu'il a bien voulu faire de mon manuscrit et pour ses pertinentes suggestions.

Au seuil de ce travail, qu'il me soit permis d'adresser un hommage respectueux à la mémoire du Professeur Emile GUYENOT dont l'enseignement magistral abondait en enthousiasme communicatif pour les Sciences de la vie.

Je tiens à témoigner aussi ma grande reconnaissance à son élève, le Professeur Kitty PONSE , de la Faculté des Sciences de Genève. La richesse remarquable de son enseignement a beaucoup contribué à mon orientation vers l'étude des interactions endocriniennes.

Je suis particulièrement redevable à Madame Geneviève MICHET dont la collaboration intelligente et qualifiée a permis la réalisation matérielle de ce travail. Je suis heureuse de pouvoir ici lui exprimer ma grande reconnaissance.

Je voudrais remercier très chaleureusement les membres des laboratoires d'Histophysiologie et d'Embryologie du Collège de France qui m'ont apporté leur aide et leur sympathie au cours de ce travail.

La dactylographie, le dessin des figures, le tirage et la reliure des exemplaires définitifs de cette thèse ont été assurés par les services du Professeur Maurice JEAN, Directeur de la division de Physique Théorique de l'Institut de Physique Nucléaire d'Orsay. C'est avec une très grande reconnaissance que je me permets de lui adresser ici tous mes remerciements.

Enfin je remercie mon mari, le Dr. Roland LOMBARD, Maître de Recherches au C.N.R.S., qui a effectué l'analyse statistique de mes résultats expérimentaux.



## Sommaire

### INTRODUCTION

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Avant - propos                                                                       | 1  |
| Analyse bibliographique :                                                            | 5  |
| I    Apparition et développement de la fonction testiculaire                         | 5  |
| II   Rôle précoce des androgènes                                                     | 6  |
| III  Développement de l'hypophyse. Comparaison avec<br>l'évolution de la gonade mâle | 7  |
| IV   Rôle possible du placenta ou de l'hypophyse maternelle                          | 9  |
| V    Cultures organotypiques                                                         | 10 |
| a) Testicule                                                                         | 10 |
| b) Hypophyse                                                                         | 12 |
| VI   Rôle possible de l'hypothalamus ante partum                                     | 13 |
| VII  Rôle de la glande pinéale                                                       | 14 |
| VIII Mécanismes d'action hormonale au cours de la<br>croissance testiculaire         | 15 |

### Première partie : ETUDE IN VIVO

#### Chapitre I

|                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Développement des gonades et de l'hypophyse chez la Souris</u> | 21 |
| 1) <u>Développement de la gonade embryonnaire et prépubère</u>    |    |
| a) Etude histologique                                             | 21 |
| b) Etude histochimique                                            | 25 |
| 2) <u>Développement de l'hypophyse embryonnaire et prépubère</u>  |    |
| Etude histologique et histochimique                               | 30 |

## Chapitre II

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Evolution pondérale des gonades et de l'hypophyse. Etude post partum.</u>                                                                    | 35 |
| A) Croissance normale chez le Rat de la naissance à la puberté                                                                                  | 35 |
| B) Comparaison avec la croissance normale chez la Souris                                                                                        | 39 |
| C) Effets de la castration pratiquée à la naissance sur la croissance des gonades, de l'hypophyse et de diverses glandes endocrines chez le Rat | 40 |

## Chapitre III

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| <u>L'épiphyse au cours du développement</u> | 45 |
|---------------------------------------------|----|

## Chapitre IV

|                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Etude du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes au cours du développement ante- et post partum.</u> | 57 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Deuxième partie : ETUDE IN VITRO

## Chapitre V

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Etude du développement in vitro de la gonade chez la Souris mâle</u> | 68 |
| 1) Etude histologique                                                   | 69 |
| 2) Etude histochimique                                                  | 72 |

## Chapitre VI

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Incorporation du <math>^{32}\text{P}</math> dans le testicule de Souris in vitro.</u> | 79 |
| DISCUSSION et CONCLUSIONS GENERALES                                                      | 89 |

## INTRODUCTION

---

### Avant - propos

Au cours de son développement, la gonade mâle des Rongeurs passe par une suite d'étapes caractéristiques quant à l'évolution de l'épithélium germinatif et quant à celle du tissu glandulaire interstitiel. L'enchaînement chronologique de ces étapes a fait l'objet d'analyses détaillées à l'aide de méthodes histologiques ou histochimiques. Dans la plupart des cas, les auteurs se sont intéressés principalement, voire uniquement, soit à l'une, soit à l'autre des lignées germinale ou endocrinienne. Les travaux de RUBASCHKIN ( 1912 ) et de TORREY ( 1945 ) font exception; ils portent en effet sur l'évolution des cellules germinales et des cellules glandulaires diastématiques et permettent d'établir certains parallélismes au cours du développement prénatal. D'autre part, la majorité des études histologiques consacrées à l'une ou à l'autre de ces " lignées ", chez le Rat et la Souris, se limite soit à la vie foetale, soit au développement post partum. Ces deux périodes ont fait l'objet de travaux publiés par les auteurs suivants : DE BURLET ( 1920 ), SIMKINS ( 1923 ), HARGITT ( 1925 ), BRAMBELL ( 1927 ) et TORREY ( 1945 ) pour la première, et ALLEN ( 1949 ), WIDMAIER ( 1963 ), STEINBERGER et DUCKET ( 1964 ) et ROOSENRUNGE et LEIK ( 1968 ) pour la seconde. Cependant, CLERMONT

et PEREY ( 1957 ), puis CLERMONT et HUCKINS ( 1961 ) et surtout SAPSFORD ( 1962 ) ont étudié les différents aspects de l'épithélium germinatif et des petites cellules épithéliales dites cellules somatiques, à la fois au cours de la vie embryonnaire et de la vie postnatale.

Depuis SAMUEL et coll. ( 1951 ), puis WATTENBERG ( 1958 ), les méthodes histoenzymologiques ont permis un grand nombre de recherches concernant en particulier le développement du tissu interstitiel diastématique chez les Rongeurs. Les principaux travaux sont ceux de NIEMI et IKONEN ( 1961 et 1962 ) et BAILLIE et GRIFFITHS ( 1965 ) pour la période pré - natale et ceux de BAILLIE ( 1961 et 1964 ), HUSEBY ( 1961 ), NIEMI et IKONEN ( 1963 ), GOLDBERG et coll. ( 1964 ) et ICHIHARA ( 1969 ) pour la vie extra-utérine. Les travaux portant sur l'évolution à la fois ante et post partum ( ROOSENRUNGE et ANDERSON 1959, HITZEMAN 1962, CHIEFFI 1964 ) donnent un aperçu de l'enchaînement des événements qui précèdent et suivent l' " étape " de la naissance.

Chez les Muridés, l'ensemble des travaux concernant le développement de la gonade mâle ( qu'il s'agisse de ses composantes germinale ou glandulaire ) montre que les différentes étapes évolutives comprennent une phase de transition au cours de laquelle les cellules prennent un aspect généralement quiescent, certaines sont pycnotiques. L'interprétation de cette phase transitoire a donné lieu à d'importantes controverses. Dans le cas du tissu germinatif, deux théories s'affrontent; l'une veut que, succédant à la génération éteinte des cellules germinales primordiales, les spermatogonies proviennent de la différenciation des cellules somatiques ( FIRKET 1920, HARGITT 1925, SIMKINS 1923, ALLEN 1949 ), l'autre que, malgré l'importance du phénomène dégénératif " périnatal ", une certaine continuité de la lignée germinale soit maintenue pendant toute l'ontogénèse ( RAUGH 1929, CLERMONT et PEREY 1957, MINTZ 1960, HUCKINS 1963 et 1965 ).

Bien que la question ne soit pas encore définitivement tranchée, la microscopie électronique, les techniques de destruction aux rayons x et d'autoradiographie ont récemment apporté de nombreux arguments en faveur de cette deuxième conception ( ROOSENRUNGE et LEIK 1968, SAPSFORD 1962, HILSCHER et MAKOSKI 1968 ).

Dans le cas de l'évolution en deux temps du tissu diastématique observée par BOUIN et ANSEL ( 1903 ), confirmée par ARON ( 1921 ) puis par les

études histochimiques, cette phase de transition est décrite soit comme une véritable involution de la glande, soit comme une période de palier ou de croissance très lente. Selon les auteurs, il s'agirait soit du passage d'une génération foetale de cellules à une génération prépubère et mature ( NIEMI et IKONEN 1962, 1964, chez le Rat ), soit d'une période de latence entre deux vagues de différenciation de la même lignée tissulaire ( HITZEMAN 1962, BAILLIE 1961, 1964, chez la Souris ).

Ces opinions diverses et l'argumentation qui s'y rattache font ressortir l'existence de certaines analogies mais également de différences notables entre des espèces aussi voisines que le Rat et la Souris, au cours des phases importantes du développement morphologique et physiologique de la gonade mâle.

Le dessein de notre travail a été de préciser, dans un premier temps, les caractéristiques essentielles de ces phases et le moment auquel elles se situent. Dans un deuxième temps, nous avons tenté d'analyser quelques uns des mécanismes susceptibles d'intervenir au cours des étapes clés de la croissance des glandes génitales.

" En définitive, le contrôle de la croissance et du fonctionnement de la gonade implique la mise en jeu délicatement équilibrée d'interactions entre les hormones provenant des gonades et de la glande pituitaire . "

( JACOBSON 1965 <sup>x)</sup> ).

La première partie de nos recherches a donc porté sur le développement de la gonade et de l'hypophyse ante et post partum.

Au niveau de la gonade, nous avons étudié en particulier les modalités de l'apparition de la fuchsinophilie mitochondriale, des lipides osmiophiles et de l'activité enzymatique  $\Delta^5-3\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénasique en relation avec la différenciation et la maturation des cellules interstitielles de Leydig.

Au niveau de l'hypophyse, la réaction à l' A. P. S. et le tétrachrome de Herlant nous ont permis de suivre l'apparition et l'évolution des cellules de type gonadotrope. Parallèlement, nous avons dosé le contenu hypophysaire en gonadotropines.

Nous avons ensuite essayé de mettre en évidence les effets de la castration <sup>x)</sup> " The final regulation of gonadal growth and function involves a delicately balanced interplay between hormones derived from the gonads and the pituitary gland " .

et ceux de l'épiphyséctomie, pratiquée à la naissance, sur le développement du système endocrinien et des glandes annexes. En particulier, nous avons étudié l'influence de ces opérations sur le contenu hypophysaire en hormones gonadotropes.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons étudié en culture in vitro la réponse de la gonade aux gonadotropines, d'une part au moyen de techniques histoenzymologiques et histologiques, d'autre part en mesurant le taux d'incorporation dans la gonade du  $^{32}\text{P}$  additionné au milieu de culture. Cette dernière technique nous a amené à mettre au point une nouvelle méthode grâce à laquelle nous avons pu montrer :

- 1) que le taux d'incorporation du  $^{32}\text{P}$  est stimulé par la culture en association avec des hypophyses embryonnaires ou adultes, ou par la présence, dans le milieu, d'hormones gonadotropes purifiées.
- 2) que dans ce dernier cas, cette stimulation est proportionnelle à la dose d'hormones additionnées.
- 3) que l'incorporation peut être freinée par des extraits épiphysaires anti-gonadotropes.

Etant donné le nombre de recherches effectuées sur le développement de la gonade et les facteurs qui contrôlent son évolution chez les Vertébrés, nous avons été amenée à limiter aux données sur les Mammifères et essentiellement sur les Rongeurs l'étude bibliographique qui précède l'exposé de nos travaux.

L'ordre chronologique conduit à envisager successivement l'apparition et le développement in vivo de la fonction testiculaire, chez l'embryon d'abord, puis dans les jours qui suivent la naissance. Les travaux effectués nous amèneront alors à poser le problème des relations entre le développement de l'hypophyse et l'évolution de la gonade mâle, puis à envisager le rôle possible du placenta et de l'hypophyse maternelle.

Nous analyserons ensuite certains résultats obtenus parallèlement in vitro, en culture organotypique, sur le testicule et l'hypophyse.

Finalement, nous passerons en revue quelques travaux portant sur l'intervention possible, pendant le développement, des centres neuroglandulaires diencéphaliques tels que l'hypothalamus et l'épiphysé.

Avant de conclure, nous reviendrons encore sur certaines notions récentes ayant trait aux problèmes que posent les mécanismes d'action hormonale au cours de la croissance testiculaire chez le Rat et la Souris.

## Analyse bibliographique

### I. Apparition et développement de la fonction testiculaire endocrine

#### a) Embryonnaire

Chez les Rongeurs, la gonade mâle manifeste une activité hormonale dès les premiers signes de sa différenciation morphologique alors que son activité gamétogénétique n'apparaît qu'après la naissance. Les expériences de castration embryonnaire précoce ( JOST 1947, RAYNAUD et FRILLEY 1947 ) ont montré que, dès les premiers stades de son développement, le testicule conditionne, par ses sécrétions, non seulement la formation du tractus génital mâle et des glandes annexes mais aussi l'absence de développement des glandes mammaires, ainsi que la régression des canaux de Müller. L'ablation plus tardive des gonades embryonnaires ( WELLS 1946a, JOST 1947, RAYNAUD et FRILLEY 1947 ) a des conséquences moins nettes, en ce sens qu'une certaine croissance ( inférieure à la normale ) des glandes annexes et du canal déférent se poursuit. L'injection de propionate de testostérone, l'implantation sous - cutanée ou intra - abdominale de cristaux d'androgènes permettent de rétablir en grande partie une morphogénèse normale chez les mâles castrés.

#### b) Post partum

La castration à la naissance ( CLARK 1935b, WIESNER 1934 - 1935, PRICE 1936, PFEIFFER 1936, LIBMAN 1953 ) a montré l'existence de relations entre la gonade et l'hypophyse dès les premiers jours de la vie post - natale. HARRIS et JACOBSON ( 1952 ), SEGAL et JOHNSON ( 1959 ), puis BARRACLOUGH et GORSKI ( 1961 ) et GORSKI et WAGNER ( 1965 ) ont apporté la preuve que ces relations étaient, non pas directes, mais établies par l'intermédiaire de l'hypothalamus. Il semble donc que les sécrétions testiculaires chez la Souris et le Rat nouveau - né ( jusqu'au 6e jour ) soient responsables de l'orientation définitive, dans le sens mâle, des structures cérébrales qui commandent la fonction gonadotrope adénohypophysaire ( acyclique ). Signalons que chez d'autres Rongeurs ( Cobaye ) c'est dans la seconde moitié de

la gestation qu'a été située la période critique de différenciation hypothalamique. HARRIS ( 1964 ) conclut de ces résultats que les androgènes jouent un rôle au cours du développement, non seulement sur la différenciation du tractus génital, mais aussi sur celle du système diencéphalo - hypophysaire.

C'est à l'analyse succincte de ce rôle précoce des androgènes que nous allons consacrer le paragraphe suivant.

## II. Rôle précoce des androgènes

L'injection à la Ratte gestante d'antiandrogènes ( cyprotérone ) dès l'époque de la différenciation sexuelle embryonnaire ( NEUMANN et ELGER 1966, FORSBERG et coll. 1968 ) inhibe le développement de la prostate ventrale chez le fœtus mâle, ce qui rappelle les résultats de JOST ( 1953 ) après castration chez le Lapin : au moment de l'apparition des premiers bourgeons prostatiques, une certaine stimulation testiculaire est nécessaire au développement normal des futurs lobes de la glande. Les expériences de FORSBERG et coll. montrent que lorsque le traitement aux antiandrogènes est prolongé post partum, les effets enregistrés au niveau de la gonade et des glandes annexes ne diffèrent pas. NEUMANN et coll. ( 1967 ) n'ont pas obtenu ces effets en injectant la cyprotérone seulement après la mise bas. Par contre en faisant agir cette substance depuis le 13<sup>e</sup> jour de la gestation et jusqu'au 21<sup>e</sup> jour qui suit la naissance, NEUMANN et ELGER ( 1966 ) empêche la différenciation des centres hypothalamiques mâles et des caractères sexuels secondaires. Il n'est donc pas exclu que les androgènes testiculaires exercent chez le Rat, dès la période prénatale, leur influence décisive au niveau des centres nerveux régulateurs de la fonction gonadotrope mâle. Ces centres semblent doués d'une très grande sensibilité puisqu'une légère chute, parfois temporaire, du taux d'androgènes circulant ( cryptorchidie : MARTINS et DE MELLO 1935, COURVOISIER et coll. 1952 ; hémicastration : DESCLIN 1934 ) peut provoquer l'apparition de cellules de castration dans l'hypophyse. D'autre part, de très faibles doses de pro-pionate de testostérone ( 0.003 - 0.03 mg injectés pendant 12 jours ) ont une action inhibitrice sur les centres régulateurs de la fonction gonadotrope ( NEUMANN 1966 ), alors qu'aucun effet n'est enregistré au niveau des glandes annexes.

### III. Développement de l'hypophyse. Comparaison avec l'évolution de la gonade mâle.

Le problème se pose en effet de savoir dans quelle mesure l'hypophyse embryonnaire est susceptible d'intervenir pour stimuler l'activité sécrétrice du testicule foetal. L'analyse de J.A.A. BENOIT ( 1962 ) résume avec beaucoup de précision et de clarté l'essentiel des notions qu'apporte la littérature sur cette question.

L'apparition dans l'hypophyse de Lapin de cellules A. P. S. positives précède de peu la période critique du développement de la glande androgène; ces cellules deviennent rapidement très nombreuses et très actives pendant cette période puis elles se dégranulent et offrent, en fin de gestation, un aspect pratiquement A. P. S. négatif ( JOST et GONSE 1953 ).

Chez le Rat, alors que les méthodes de dosages hypophysaires utilisées par CONTOPOULOS et SIMPSON ( 1957 ) n'ont pas permis de détecter la présence de gonadotropes chez l'embryon, JOST et TAVERNIER ( 1956 ) observent des cellules A. P. S. positives dès le 15e jour de gestation. Par la suite, ils notent une période de " vacuolisation intense et curieuse "; cependant, jusqu'à la fin de la gestation, la zone gonadotrope hypophysaire reste riche en inclusions A. P. S. positives. Dans les jours qui suivent la naissance, CLARK ( 1935a ), ainsi que McQUEEN - WILLIAMS ( 1935 ) ont pu doser un taux de gonadotropes hypophysaires faible mais qui va en augmentant régulièrement jusqu'à la puberté.

La microscopie électronique ( MAILLARD 1963 ) a montré, dès le 18e jour de gestation, l'existence de cellules à grains de sécrétion de la taille de ceux des cellules gonadotropes; ces grains se forment dans la zone golgienne et semblent être excrétés au niveau de certaines invaginations de la membrane plasmatique. Les études histochimiques montrent, au niveau du testicule, que l'activité enzymatique du tissu interstitiel débute au 15e jour, va en augmentant jusqu'à la naissance ( ROOSENRUNGE et ANDERSON 1959, NIEMI et IKONEN 1961 et 1962, CHIEFFI 1964, PICON et OTTOWICZ 1967 et EGUCHI et MORIKAWA 1968 ) et régresse après le 3e jour post partum. L'analyse biochimique montre également que le taux de conversion de la progestérone en androgènes, au niveau du tissu interstitiel foetal, est mesurable dès le 15e jour et atteint à 18 ½ jours un palier maximum qui se poursuit jusqu'au premier jour post partum.

Chez l'embryon de Souris, la microscopie électronique ( SANO et SASAKI 1969 ) a mis en évidence l'apparition de cellules à granulations du type FSH et LH dès le 16e jour de gestation. Du 16e au 17e jour, les cellules à FSH sont plus nombreuses que les cellules à LH. Les auteurs signalent des figures suggérant la décharge de granules gonadotropes. A partir du 18e jour, les cellules de type TSH, FSH et LH ( sécrétion glycoprotidique ) passent par une période de régression comparativement aux cellules acidophiles ( STH ) dont le nombre augmente beaucoup en fin de gestation. L'étude de l'interstitielle testiculaire montre dès la naissance une réduction très importante du nombre de mitoses ( HITZEMAN 1962, BAILLIE 1961, HART et coll. 1966 ), le cytoplasme des cellules paraît atrophié, il se vacuolise; certaines cellules ont un noyau pyknotique. Cette période de palier dans le développement du tissu interstitiel s'amorce déjà en fin de gestation et se reflète aussi au niveau de l'activité enzymatique ( SCHEIB et LOMBARD, sous presse ).

L'hypophysectomie foetale pratiquée avec des techniques différentes, irradiation chez la Souris ( RAYNAUD 1947 ), décapitation chez le Lapin et le Rat ( JOST 1947, WELLS 1947 ), et à des stades différents du développement, conduit à des résultats difficilement conciliables quant à ses répercussions sur la gonade mâle.

Chez la Souris, aucun effet n'a été enregistré au niveau du tissu interstitiel, par contre, le nombre de cellules germinales et la taille des cordons sexuels sont réduits.

Chez le Lapin, les anomalies dues à la décapitation, si elle est pratiquée avant le 22e jour de gestation ( période critique correspondant à l'apparition de signes d'activité sécrétoire dans l'hypophyse foetale ), sont très importantes; elles sont de moins en moins importantes si l'intervention est effectuée plus tard ( 22e - 24e jour ).

Chez le Rat, les résultats de JOST et COLONGE ( 1949 ) ne montrent pas d'atrophie marquée du tissu interstitiel mais un retard de croissance des glandes annexes après " hypophysectomie " au 16e jour de gestation; WELLS ( 1946b et 1950 ), opérant à 17 - 18 jours, obtient une diminution du nombre, de la taille et des granulations cytoplasmiques des cellules interstitielles testiculaires mais il n'observe pas d'effet sur les glandes annexes.

Ces travaux soulèvent la question du seuil de sensibilité des cellules de Leydig à l'action hormonale et de l'évolution de ce seuil au cours du développement. Dès 1933, ARON a démontré, chez le Cobaye, que le tissu diasté -

matique était capable de répondre à une stimulation gonadotrope exogène. Chez le Lapin comme chez le Rat, les gonadotropines injectées au foetus décapité annulent les effets de l' " hypophysectomie ". Chez le Rat en particulier, la sensibilité des cellules interstitielles ( hypertrophie, hyperactivité, osmiophilie intense ) aux hormones gonadotropes a été démontrée in situ ( WELLS 1950 ) ou en greffe sur les vésicules séminales d'un hôte adulte castré, hypophysectomisé puis traité aux gonadotropines ( JOST et COLONGE 1949, JOST 1953 ).

Plus récemment, EGUCHI et MORIKAWA ( 1968 ) obtiennent après décapitation embryonnaire en fin de gestation une inhibition de la croissance testiculaire et du développement du tissu de Leydig. L'injection de gonadotropes placentaires ( GTH ) aux hypophysectomisés permet de rétablir le développement testiculaire; l'injection de testostérone ne rétablit que la croissance des cordons.

#### IV Rôle possible du placenta ou de l'hypophyse maternelle.

In vivo, l'intervention possible de facteurs gonadotropes placentaires au cours du développement de la gonade pose un problème.

Dès le milieu de la gestation, des cellules à granulations glycoprotidiques A.P.S. positives ont été observées dans le placenta à l'aide de la microscopie électronique et des techniques histochimiques ( WISLOCKI et coll. 1957, DICKSON et BULMER 1960 ). Les méthodes d'extraction biochimique ont d'ailleurs permis d'isoler du placenta de Rat et de Souris des facteurs lutéotropes et mammatropes ayant certaines propriétés gonadotropes ( NEWTON et BECK 1939, HISHAW et ASTWOOD 1942, AMOROSO 1955, AVERILL et coll. 1950, CERRUTI et LYONS 1960 et MATTHIES 1968 ).

Par contre, explanté et greffé ( JOST et MILLOT 1953, CANIVENC et MAYER 1953 ), le placenta de Rat ne manifeste pas d'activité gonadotrope. Toutefois, selon AMOROSO et PORTER ( 1966 ), la signification fonctionnelle du placenta in vivo, parallèlement à celle de l'hypophyse maternelle, serait très importante.

Signalons enfin que chez l'Homme, la période de différenciation sexuelle foetale correspond à celle du développement du tissu de Leydig et également au taux maximum d'excrétion gonadotrope urinaire de la mère. Il y aurait à ce moment, pour l'embryon, deux sources de gonadotropes : l'hypophyse foetale et le placenta. Par la suite, le contenu placentaire en gonadotrope diminue, laissant supposer que seule l'hypophyse maintient le tissu interstitiel en activité.

Enfin, au cours des trois derniers mois, le taux de LH circulant ne suffit plus à stimuler la glande androgène qui régresse assez brusquement ( voir références JOST 1966 ).

Mentionnons en outre qu'un grand nombre d'observations effectuées chez les Muridés semblent suggérer l'existence d'une corrélation entre le placenta et le système hypothalamo - hypophysaire de la mère. Chez la Souris gestante, l'hypophyse s'avère indispensable au maintien en activité du tissu interstitiel ovarien, alors que sa fonction FSH peut être assurée par le placenta ( GARDNER et ALLEN 1942 ). Chez le Rat, au contraire, l'inverse se produit ( CONTO - POULOS et SIMPSON 1959 ).

Une question fondamentale reste cependant : l'activité gonadotrope de l'hypophyse maternelle peut - elle atteindre le fœtus via la barrière placentaire ? M. ARON ( 1930 ) puis PETERSON et YOUNG ( 1952 ) enfin NIKITOVITCH et KNOBIL ( 1955 ) ont montré qu'une des hormones glycoprotidiques, la TSH, ne traversait pas les membranes trophoblastiques. Néanmoins il faut relever l'existence d'un certain parallélisme entre l'évolution du contenu en gonadotropes de l'hypophyse maternelle et l'évolution de l'interstitielle dans le testicule foetal aussi bien chez le Rat que chez la Souris ( LADMAN et RUNNER 1953, CONTOPOULOS et SIMPSON 1956 ).

Les méthodes de culture in vitro, en soustrayant le testicule foetal aux multiples facteurs constituant " son milieu intérieur " in situ, ont permis de voir dans quelle mesure le développement normal de la gonade dépend d'influences extérieures et ont pu apporter des réponses partielles aux différents problèmes qui se posent in vivo.

Nous résumerons brièvement l'essentiel des résultats acquis par cette technique sur le testicule d'abord, sur l'hypophyse ensuite.

## V. Cultures organotypiques

### 1) Testicule

#### a) Etude du tissu germinatif

Chez la Souris embryonnaire, du point de vue morphologique, la différenciation de la gonade en testicule peut s'effectuer in vitro ( WOLFF 1952 ), mais les cordons sexuels ainsi formés sont stériles ou contiennent un nombre

de gonocytes réduit ( BORGHESE et VENINI 1956, ASAYAMA et FURU - SAWA 1961 et BREWER 1962 ) allant de pair avec l'apparition d'altérations cellulaires : noyaux très foncés et denses.

Ces gonades mâles, explantées lorsque leur différenciation est amorcée, s'avèrent capables de poursuivre leur développement dans une certaine mesure : organisation des cellules somatiques et germinales, mitoses, croissance des cordons.

Prélevées plus tard ( fin de la gestation ou début de la vie post partum ), elles poursuivent une évolution allant jusqu'à l'entrée en division réductionnelle des cellules germinales ( MARTINOVITCH 1937 et 1938, GAILLARD et VAROSSIEAU 1938 ). Cette phase représente un tournant décisif pour la cellule germinale car après avoir atteint le stade pachytène de la prophase méiotique, les spermatocytes ne poursuivent pas leur différenciation en spermatides et cela quelle que soit la richesse du milieu de culture en vitamines A, C, E et en glutamine ( STEINBERGER et STEINBERGER 1966 ). Bien au contraire, en prolongeant le temps en culture, la lignée germinale se dédifférencie et, au bout de quelques semaines, les tubes séminifères ne sont plus formés que de spermatogonies primitives et d'éléments sertoliens qui continuent à croître et à survivre. Cette dédifférenciation a modifié fondamentalement la gonade, son retour à l'état embryonnaire semble irréversible : greffé chez un jeune Rat après une telle période en culture, le testicule n'entrera plus en spermatogénèse.

#### b) Etude du tissu de Leydig

Le développement in vitro de la glande interstitielle a été étudié par DUX 1939, puis LOSTROH 1960, MEUNIER et BOUSQUET 1964, PICON 1967, Ce dernier travail montre que la différenciation du tissu de Leydig embryonnaire, chez le Rat, peut s'effectuer in vitro; son évolution se poursuit parallèlement au développement normal, malgré un aspect réduit du cytoplasme pouvant " indiquer une baisse de l'activité glandulaire ". Explantés à la naissance ou dans les jours qui suivent, les cellules interstitielles glandulaires présentent des signes d'atrophie que l'adjonction d'hormones gonadotropes au milieu supprime totalement ( DUX, LOSTROH, BOUSQUET et MEUNIER 1968 ).

Du point de vue physiologique, les associations de testicule foetal avec divers éléments du tractus génital d'une part, les études histochimiques d'autre part, ont montré que la glande diastématique développait son activité sécrétoire in

vitro. C'est WOLFF qui, le premier, a abordé cette question fondamentale chez les Oiseaux et lui a apporté une réponse définitive ( WOLFF et coll. 1952 ). Par la suite, WOLFF et WENIGER ( 1953 et 1954 ), WENIGER ( 1964 ), PRICE et PANNABECKER ( 1956 ), PANNABECKER et PRICE ( 1960 ), PICON ( 1967 ) ont repris cette étude chez les Mammifères. En outre, les techniques d'extraction biochimique montrent que le tissu interstitiel embryonnaire synthétise in vitro l'androsténédione et la testostérone ( WENIGER et coll. 1967 ).

Notons toutefois que l'activité sécrétoire du tissu de Leydig du Rat nouveau - né n'est pas identique in vitro à celle que l'on observe in vivo; cependant l'action d'hormones gonadotropes, soit incorporées au milieu de culture, soit injectées avant l'explantation permet d'obtenir une stimulation de la fonction endocrinienne testiculaire. Cette stimulation se manifeste par un accroissement de l'activité enzymatique ( STEINBERGER et coll. 1956 ) ou par une action au niveau des glandes annexes ( LOSTROH 1960 ).

## 2) Hypophyse

Chez les Rongeurs, l'activité gonadotrope de la glande pituitaire in vitro a surtout été étudiée dès la naissance : chez le Rat ( MARTINOVITCH 1954, MOSZKOWSKA 1961, BOUSQUET et MEUNIER 1968 ), chez le Cobaye ( PETROVIC 1961 et 1963 ). Ces derniers travaux montrent que l'hypophyse du nouveau - né se comporte in vitro de façon semblable à l'hypophyse adulte. Les cellules adénohypophysaires se dégranulent en 5 - 6 jours mais conservent l'aspect morphologique ( microscopie optique et électronique ) de cellules sécrétrices qui auraient perdu la capacité de stocker leur matériel granulaire ( état dit de " pseudoanamorphose " ). En l'absence de connections hypothalamiques, l'hypophyse est donc capable d'assurer un " fonctionnement de base " que l'association avec un effecteur, comme le testicule de Souris nouveau - né, permet de mettre en évidence ( taille des cellules de Leydig, diamètre des tubes ). Cette dégranulation des explants hypophysaires est réversible : lorsque ceux - ci sont greffés in vivo, après 3 - 7 semaines en culture, l'accumulation du matériel chromophile réapparaît dans le cytoplasme.

L'hypophyse de Rat impubère en culture pendant 8 - 9 semaines sur milieu liquide ( MARTINOVITCH 1954 ) conserve en partie son apparence d'activité

sécrétoire ( chromophilie parfois très intense des cellules, turgescence cytoplasmique ). Des figures de mitoses sont visibles dans les cellules chromophobes ressemblant aux cellules de castration.

Les hypophyses de Rats adultes normaux ou castrés font preuve, après 8 jours de culture en présence de testicule impubère, d'une nette activité gonadotrope ( tissu interstitiel hypertrophié, mitoses des spermatogonies et des spermatocytes ), BOUSQUET et MEUNIER ( 1968 ).

Signalons enfin que selon MOSZKOWSKA ( 1956 et 1965 ), le pouvoir gonadotrope d'hypophyses en cultures organotypiques peut être inhibé par la présence de tissu épiphysaire. Nous reparlerons plus loin de cette notion d'antagonisme épiphyso - hypophysaire et de son rôle au cours du développement.

#### VI. Rôle possible de l'hypothalamus ante partum.

L'existence probable d'une certaine réceptivité des centres diencephaliques aux androgènes du testicule foetal ( JACOBSON 1965, FORSBERG et coll. 1968, voir partie II ) pose le problème de l'établissement de relations hypothalamo - hypophysaires avant la naissance. Nous examinerons ici cette question du point de vue ontogénique essentiellement.

Chez le Rat ( GLYDON 1957, ENEMAR 1961 ), le réseau vasculaire du plexus primaire est suffisamment développé dès le 18e jour de gestation pour assurer une liaison entre l'éminence médiane et la pars distalis. Chez la Souris ( ENEMAR 1961 ), c'est au 16e jour déjà que de nouveaux capillaires permettent une communication entre le lobe distal hypophysaire et le plexus primaire. Ces travaux établissent la possibilité anatomique de l'existence d'un axe hypothalamo - hypophysaire embryonnaire. Qu'en est - il au niveau de l'hypothalamus lui - même ? Les différentes étapes de son développement ontogénique ont été décrites comme très semblables chez le Rat et la Souris ( HYPPA 1969 ) : apparition de l'ébauche hypothalamique avant le 16e jour de la vie ante partum chez la Souris, différenciation des noyaux suprachiasmatique, supraoptique, arqué, paraventriculaire et ventromédian entre le 17e et le 18e jour. Dès cette époque les cellules neuro - sécrétrices sont visibles. A la naissance, les différents noyaux ont leur aspect adulte définitif; cependant, la fluorescence spécifique des catécholamines primaires ne prend une réelle importance qu'au cours des premiers

jours post partum ( ENEMAR 1961, BJORKLUND et coll. 1968, OWMAN et LOMBARD inédit ).

Signalons que, chez le Lapin, le plexus primaire du système porte est formé à partir du 21e - 22e jour de gestation ( CAMPBELL 1966 ), au moment où les cellules A.P.S. positives se multiplient dans l'hypophyse et où la fonction androgène du testicule est très importante ( JOST et JACQUOT 1953, JOST et GONSE 1953 ). Chez l'Homme, au contraire, ( ROMEIS 1940, LEVINA 1965, PAVLOVA 1966, GAINET 1969 ), la différenciation des catégories cellulaires dans l'adénohypophyse embryonnaire serait beaucoup plus précoce ( 2e - 3e mois ) que l'établissement d'une circulation porte hypothalamo - hypophysaire ( 5e mois, WISLOCKI 1937 ). Cependant, les expériences de transplantation d'hypophyse embryonnaire humaine dans la selle turcique de Rat adulte hypophysectomisé ( LEVINA 1968 ) indiquent que le dimorphisme sexuel observé dès le début du 5e mois quant au contenu gonadotrope hypophysaire résulte d'une différenciation sexuelle hypothalamique due aux sécrétions testiculaires fœtales.

Il ne paraît pas exclu, au vu des travaux récents que nous venons de citer, de concevoir l'existence prénatale de relations neuroendocriniennes.

## VII. Rôle de la glande pinéale

En plus des centres hypothalamiques, il est possible que l'épiphyse possède un rôle dans la régulation de la fonction gonadotrope. En effet, les travaux de microscopie électronique ont apporté la confirmation définitive de la nature glandulaire de cet organe ( MILOFSKY 1958, IRALDI et DEROBERTIS 1961 et ARIENS KAPPERS 1961 ).

Au cours du développement, l'épiphyse a été étudiée chez les Rongeurs par GARDNER ( 1949 ), ARIENS KAPPERS ( 1961 ) et OWMAN ( 1961 ) pour la période prénatale, par IZAWA ( 1925 ), QUAY et LEVINE ( 1957 ), LOMBARD - DES GOUTTES ( 1966a et b ), DILL et WALKER ( 1966 ), ITO et MATSUSHIMA ( 1968 ) pour la période postnatale. OWMAN ( 1961 ) constate des signes d'importante activité sécrétrice chez l'embryon de Rat entre le 17e et le 19e jour. A la fin de la gestation, cette activité disparaît presque complètement.

Les différents travaux effectués dès la naissance montrent d'une part, que l'épiphyse a un index mitotique qui décroît beaucoup au cours des 15 premiers

jours, d'autre part, que sa croissance pondérale s'effectue en 2 temps : elle est très rapide pendant la première semaine, considérablement plus lente par la suite.

L'épiphysectomie pratiquée chez l'embryon ( OWMAN 1964 ) ou dès la naissance ( ANDERSEN et WOLF 1934, KINCL et BENAGIANO 1967, LOMBARD - DES GOUTTES 1967 ) ne modifie pas de façon importante et durable la fonction gonadotrope en voie de développement.

Cependant, les méthodes de fluorescence spécifique et d'analyse enzymologique ou biochimique ( ZWEIG et coll. 1966, HÅKANSON et coll. 1967 et MACHADO et coll. 1968 ) permettent de mettre en évidence dès l'époque " périnatale " la présence dans le parenchyme épiphysaire de monoamines ( 5 - hydroxytryptamine ) et de tryptophane hydroxylase; signalons en particulier que l'activité de cette enzyme atteint 80 % de son activité adulte au 5e jour post partum. Il ne paraît donc pas impossible qu'au cours du développement déjà, l'épiphysse puisse jouer le rôle avant tout modulateur de l'équilibre hormonal gonadotrope qui caractérise sa fonction à l'âge adulte ( MOSZKOWSKA et EBELS 1970 ).

#### VIII. Mécanismes d'action hormonale au cours de la croissance testiculaire.

Différents travaux récents tendent à montrer que le développement testiculaire chez les Muridés s'effectue sous le contrôle constamment équilibré des facteurs gonadotropes et des stéroïdes sexuels.

Le rôle exercé par les androgènes sur le tissu interstitiel et sur la spermatogénèse a été mis en évidence au cours des étapes successives de la croissance. En effet, selon EGUCHI et MORIKAWA ( 1968 ), la testostérone administrée à des foetus hypophysectomisés empêche le retard du développement pondéral testiculaire mais non l'involution du tissu de Leydig que provoque l'intervention. D'autre part, selon NEUMANN ( 1966 ), FORSBERG et coll. ( 1968 ), NEUMANN et coll. ( 1968 ), l'administration pré - ou postnatale de cyprotérone a pour conséquence directe ou indirecte d'inhiber l'évolution spermatogénétique. L'injection de testostérone contrecarre cet effet. Selon NEUMANN, les faibles doses d'androgènes injectées à l'animal impubère inhibent la gonade par l'intermédiaire des centres hypothalamo - hypophysaires, alors que les fortes doses stimulent directement le tissu séminifère.

LOSTROH ( 1969 ) a analysé, après hypophysectomie chez l'animal prépu - bère, les réponses différentes obtenues par injections d'hormones gonadotropes ou de testostérone. Elle a montré que :

FSH seule stimule le développement des tubes et du poids testiculaire mais n'établit jamais complètement la spermatogénèse.

LH seule stimule le développement du tissu interstitiel.

FSH et LH associées induisent la spermatogénèse et la spermiogénèse et activent la fonction androgène testiculaire 3 - 4 fois plus que LH seule.

La testostérone seule, à des doses fortes, amène les spermatocytes primaires aux dernières étapes de la méiose mais inhibe le tissu interstitiel.

Aux doses administrées, la testostérone et FSH ne semblent pas agir en synergie.

STEINBERGER et DUCKET ( 1965 ) comparent l'action des oestrogènes administrés dès la naissance ( chute du poids testiculaire, aucun retard du démarrage de la spermatogénèse mais arrêt de celle - ci au stade pachytène ) et l'action de la testostérone dans les mêmes conditions ( maintien partiel de la croissance testiculaire, déroulement normal de la spermatogénèse jusqu'au spermatocytes primaires mais apparition considérablement retardées des spermatides et arrêt de la spermiogénèse à mi - étape ). Dans l'interprétation de ces résultats, il faut tenir compte des possibilités d'actions directes ou ( et ) indirectes ( sur le système nerveux central ) des stéroïdes sexuels.

D'autre part, les travaux in vitro ont apporté la preuve de l'action stimulatrice de FSH sur la biosynthèse des protéines dans le testicule impubère ( MEANS et HALL 1967 ).

En culture organotypique, STEINBERGER et STEINBERGER ( 1965 et 1966 ) ont constaté que le testicule explanté au 4e jour post partum était capable, en l'absence de gonadotrope hypophysaire mais dans un milieu très enrichi en vitamines ou en glutamine, d'effectuer les étapes de la spermatogénèse allant jusqu'au stade pachytène. Ces auteurs ne mentionnent pas l'état du tissu interstitiel mais les figures publiées montrent l'aspect aplasié de ce tissu.

Il semble donc qu'in vitro comme in vivo, la formation de spermatides nécessite la présence des deux hormones gonadotropes et par conséquent celle d'androgènes circulant - LH ayant pour effet premier d'activer la fonction endocrinienne testiculaire -; d'autre part il semble également que la testostérone seule ne suffise pas à assurer la survie et l'entrée en division réductionnelle

de plus de 30 % des spermatogonies. Ainsi au cours de l'évolution de la gonade mâle, non seulement les hormones hypophysaires mais aussi les androgènes endogènes paraissent jouer un rôle important.

En définitive, les observations faites in vitro et in vivo indiquent que le maintien de la spermatogénèse jusqu'aux stades de la méiose nécessite l'action des hormones gonadotropes alors que d'autres facteurs ( comme la glutamine ) pourraient être impliqués dans l'initiation de ce processus chez l'impubère.

Nous n'analyserons pas ici les nombreux travaux effectués chez l'adulte, qui traitent des problèmes que pose le contrôle hormonal du fonctionnement testiculaire ( voir ORTAVANT et COUROT 1966 ).

Nous nous contenterons de rappeler :

d'une part les travaux de HUSEBY ( 1961 ) qui parlent en faveur d'une activité primaire gonadotrope sur les cellules de Leydig se situant, dans l'enchaînement des étapes de la stéroïdogénèse, à un niveau antérieur à la formation de prégnénolone et d'une activité secondaire, de type trophique, portant sur la dilatation du cytoplasme et de la division cellulaire;

d'autre part les travaux de YOKOE et coll. ( 1970 ) selon lesquels la synthèse des phospholipides dans le testicule est stimulée in vitro par FSH et par LH; dans le cas d'une stimulation par FSH, cette synthèse s'effectue au niveau des tubes;

enfin les travaux de VON BERSWORDT et coll. ( 1968 ) montrant que chez l'hypophysectomisé, l'effet de l'administration simultanée d'antiandrogènes et de FSH, en supprimant l'action des androgènes endogènes sur les spermatocytes, inhibe la formation des spermatides.

Les remarques précédentes ont trait dans l'ensemble à l'aspect physiologique des modes d'action des hormones. C'est un premier pas vers l'explication intime des interdépendances qui nécessite la connaissance des mécanismes d'action à l'échelle subcellulaire. Dans les organes en développement, ces mécanismes agissent à deux niveaux qui ne sont pas forcément dissociables : la croissance et la régulation.

Les mécanismes d'action des hormones demeurent pour une large part encore inconnus. Certains arguments, passés en revue récemment par TATA ( 1968 ), suggèrent un schéma général dans lequel les hormones de croissance et de développement contrôlent la synthèse des protéines via une action sur la

synthèse d'ARN messager, d'une façon analogue au contrôle de la synthèse des protéines par le système inducteur - répresseur chez les bactéries ( WATSON 1968 ). L'auteur cite, à titre d'exemple, le contrôle exercé par l'hormone de croissance ( STH ) sur la vitesse de prolifération des ribosomes et des membranes de réticulum endoplasmique parallèlement à une croissance temporaire de synthèse d'ARN et des phospholipides du micrososome.

D'autre part, un ensemble de travaux récents tend à montrer le rôle de médiateur de l'action hormonale que pourrait jouer l'AMP cyclique. L'adénylate cyclase serait stimulée par une action de l'hormone sur la membrane, stimulation qui engendrerait les effets biologiques. Les mécanismes impliqués et les arguments en faveur de ce type d'action ont été revus par MOREL ( 1968 - 1969 ). Pour des hormones telles que l'adrénaline et l'ACTH, il semble que ce modèle illustre bien la réalité. Certains arguments font penser que les gonadotropines pourraient entrer dans cette catégorie mais les résultats sont encore incomplets. Par contre, l'action des hormones stéroïdes semble indépendante de l'AMP cyclique mais liée à la présence d'une protéine de transport plasmatique ( BEAULIEU 1970 ).

A l'heure actuelle, la complexité des phénomènes ne permet pas d'ébaucher un schéma général valable à l'échelle des Métazoaires. Une description plus détaillée des mécanismes d'action, dans la mesure où elle ferait ressortir certaines étapes spécifiques, pourrait conduire à une meilleure compréhension des processus fondamentaux marquant l'établissement des corrélations neuro-endocriniennes.

Cette revue bibliographique donne un aperçu des diverses questions auxquelles se rattache le développement de la gonade mâle. Les interactions neuroendocrinologiques posent des problèmes vraisemblablement encore plus complexes dans les structures en croissance que chez l'adulte, du fait de leur interférence avec les processus de différenciation. L'analyse succincte des travaux publiés dans ce domaine fait ressortir certains de ces problèmes. Nous n'en mentionnerons pour mémoire que quelques-uns qui nous paraissent plus importants :

1) Au cours de l'élaboration des deux principales lignées tissulaires qui constituent la gonade mâle, quelle est la part du " bagage génétique " et quelle est celle du milieu ambiant pouvant comporter une influence hormonale ?

- 2) A quel moment l'influence hormonale est - elle susceptible d'intervenir et quels en sont les facteurs inducteurs ou modulateurs ? La réponse observée est - elle due à l'apparition d'un facteur extérieur ou à une modification dans la cellule réceptrice qui la rend " compétente " ?
- 3) Dans quelle mesure peut - on considérer que l'apparition d'une constitution morphologique ( ou d'une activité enzymatique ) coïncide avec celle d'une spécification physiologique ?
- 4) L'ontogénèse du testicule sous - entend - elle une dissociation spermatodiastématique ? Les étapes caractéristiques de la croissance de la gonade mâle apparaissent - elles à la suite d'une certaine évolution 1° au niveau hypophysaire 2° au niveau testiculaire ? Y a - t - il des signes d'interaction précoce entre le tissu interstitiel glandulaire et l'épithélium germinatif ?

Nous nous sommes efforcée de répondre partiellement à certaines de ces questions. Dans ce but nous avons étudié :

- 1) Le développement in vivo et in vitro de la gonade mâle depuis le stade indifférencié.
- 2) In vitro : l'influence sur ce développement de facteurs gonadotropes ou antigonadotropes. L'apparition dans l'hypophyse foetale de cellules du type FSH et LH. La sensibilité précoce du système hypothalamo - hypophysaire aux variations du taux d'androgènes circulant.
- 3) L'apparition in vivo et in vitro d'une activité enzymatique spécifique ( la  $\Delta^5 - 3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase ) dans l'interstitielle en relation avec la différenciation des cellules de Leydig.
- 4) L'évolution en parallèle chez deux espèces voisines, le Rat et la Souris, de la lignée germinale, de la lignée diastématique, de l'aspect des cellules à FSH et LH et du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes.

Nous avons utilisé, comme matériel expérimental, la Souris en ce qui concerne les points 1) et 3) , le Rat et la Souris pour les points 2) et 4) .



P r e m i è r e   p a r t i e

E T U D E   I N   V I V O

---



## Chapitre I

### DEVELOPPEMENT DES GONADES ET DE L'HYPOPHYSE

#### CHEZ LA SOURIS .

#### 1) Développement de la gonade embryonnaire et prépubère.

##### a) Etude histologique.

#### Introduction

L'ébauche gonadique ou crête génitale est adjacente au mésonéphros, elle est formée d'un épithélium germinatif voisinant avec une zone de mésenchyme. L'épithélium en voie de prolifération va constituer le noyau épithélial. Au cours du 12<sup>e</sup> jour de gestation, la différenciation histologique de la gonade mâle est marquée par l'infiltration de travées mésenchymateuses qui séparent l'épithélium germinatif du noyau et pénètrent dans ce dernier. Simultanément, les premiers groupes de cellules épithéliales vont se constituer en esquisses de cordons au sein de ce noyau ( BRAMBELL 1927, RAYNAUD 1942 et BORGHESE 1956 ). On y distingue :

1°) Les cellules germinales primordiales qui ont migré à travers la paroi intestinale entre le 9e et le 12e jour. Elles sont caractérisées par un grand noyau ovale et un cytoplasme peu chromophile.

2°) Des cellules à noyau beaucoup plus irrégulier contenant plusieurs nucléoles acidophiles et une chromatine très dense.

3°) Des cellules de type intermédiaire.

A partir du 13e jour, le testicule est formé de cordons bien distincts entre lesquels le tissu interstitiel se développe.

Vers la fin de la gestation, les gonocytes cessent de se diviser, leur noyau se dilate considérablement ( SAPS FORD 1962 ). Ils reprennent une activité mitotique au cours de la première semaine post partum, au moment de migrer vers la périphérie des tubes pour y prendre l'aspect de gonies primordiales. Dans l'interstitielle au contraire, les cinèses décroissent après la naissance ( HITZEMAN 1962 ).

Par la suite ( 7e - 21e jour ), les spermatocytes du premier cycle spermatogénétique apparaissent dans les cordons et évoluent en spermatides, alors que d'une part des spermatogonies de type A restent en réserve contre la paroi des tubes et que d'autre part beaucoup de jeunes spermatocytes dégènèrent.

### Matériel et méthode

Notre travail a été effectué sur des Souris albinos de souche Swiss N.M.R.I. - HAN. E.V.I.C. - C.E.B.A. de Gainville, placées dans des conditions d'élevage standard :

12 heures d'éclairement par jour, température 20 - 22 °C, nourriture par aliments composés complets commerciaux U.A.R., eau ad libitum. Ce matériel expérimental présente les avantages d'une remarquable fécondité au laboratoire et d'une grande régularité dans l'enchaînement chronologique des étapes du développement, ceci étant dû en partie à la très courte durée de la vie embryonnaire. C'est au professeur GROBSTEIN et à son école que nous devons d'avoir appris à apprécier ces avantages et à respecter rigoureusement certains principes d'élevage ( animaux mis à la reproduction par groupe de 7 ; 2 mâles et 5 femelles; fréquence de renouvellement des croisements; règles de stérilité au cours du repérage des fécondations ).

Les stades du développement in utero sont déterminés à 12 h près : le matin de la détection du bouchon vaginal est considéré comme point de départ de la gestation. La mise bas a lieu au cours du 19<sup>e</sup> jour.

Les femelles gestantes sont sacrifiées par dislocation cervicale, l'utérus entier est prélevé rapidement et les foetus en sont isolés selon le procédé décrit par GROBSTEIN ( 1953 ). Les organes sont disséqués sous binoculaire dans du liquide physiologique avant d'être fixés en vue de l'étude histologique. Dans certains cas, leur poids frais a été préalablement mesuré à la balance Mettler ( précision 0.01 mg ).

Les fixateurs utilisés sont les suivants :

Bouin - Hollande : pendant 4 - 5 jours suivant la taille des pièces.

Bouin - Hollande sublimé selon Herlant : pendant 5 - 7 jours suivis d'un passage dans le carbonate de lithium durant 8 - 12 h .

Liquide de Helly : pendant 24 h, précédant une postchromisation à froid et dans l'obscurité durant 4 ½ jours dans une solution de bichromate de potassium à 3 % suivie d'un rinçage à l'eau courante 24 - 48 h .

L'inclusion à la paraffine est effectuée par l'intermédiaire du toluène pour les pièces fixées au Bouin - Hollande ou au Helly; pour la majorité des pièces fixées au Bouin - Hollande sublimé, elle se fait après passage dans l'alcool butylique.

Toutes les pièces sont débitées en coupes sériées de 3 - 4  $\mu$  d'épaisseur et collées à l'albumine glycinée.

Nous avons eu recours, dans le cas de la gonade, à trois techniques différentes de colorations :

1) Hémalum - éosine - safran, permettant à la fois de distinguer l'éosinophilie cytoplasmique du tissu interstitiel en activité et de repérer les divers stades de division cellulaire ( réductionnelle ou non ).

2) Trichrome de Masson modifié par BENOIT et STAÜBLI ( 1951 ) en vue de la mise en évidence spécifique du chondriome fuchsinophile des cellules de Leydig.

3) Acide periodique Schiff. Cette méthode histochimique est basée sur l'oxydation à l'acide periodique des glycols (  $\text{CHOH} - \text{CHOH}$  ) libres contenus dans les polysaccharides en composés aldéhydiques (  $\text{CHO} - \text{CHO}$  ) qui sont colorés par le Schiff; elle met en évidence d'une part les cellules interstitielles

glandulaires ( BAILLIE 1961 ) d'autre part le système acrosomique de la spermatide permettant d'identifier les stades de la spermatogénèse et le cycle spermatogénétique ( LEBLOND et CLERMONT 1952 ).

La réaction McManus exigeant une contre - coloration nucléaire, nous avons systématiquement passé les lames quelques secondes à l'hémalum, avant de les monter au baume " Technicon ".

### Résultats

A 12 ½ jours, les cellules du mésenchyme pénètrent dans la couche épithéliale et se disposent en bordures dessinant le contour des premiers cordons. Aucune caractéristique de leur noyau ou de leur cytoplasme ne permet d'y distinguer les futures cellules de Leydig ( planche I fig 1 ) en microscopie optique.

Entre le 13e et le 14e jour, apparaissent les premières cellules interstitielles à caractère fuchsinophile. Elles sont groupées en un ou deux gros flots. A l'intérieur des cordons, certaines cellules sont faiblement fuchsinophiles ( planche I fig 2 ); en bordure, d'autres types de cellules le sont très fortement.

Au cours du 14e et du 15e jour, le tissu de Leydig se développe très rapidement ( grosses plages présentant des signes d'intense activité mitochondriale; nombreuses mitoses ). Cet accroissement considérable représente une étape bien définie dans le développement embryonnaire; pendant cette période, les cellules à caractère fuchsinophile disparaissent dans les cordons en croissance.

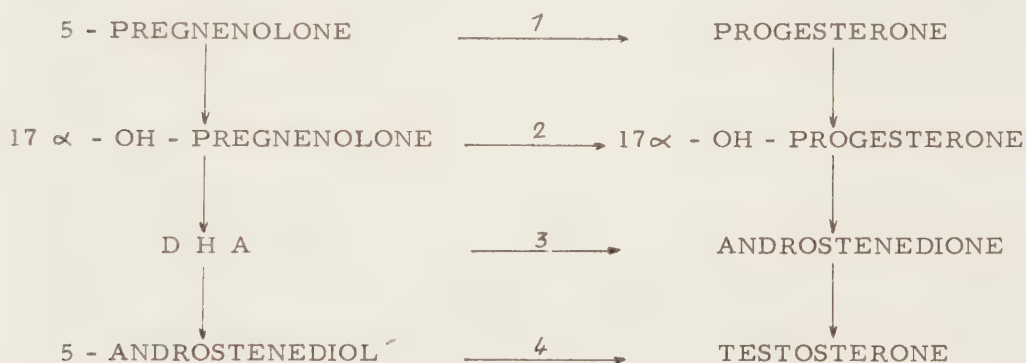
A la fin de la gestation, le tissu interstitiel n'augmente plus de façon importante quant au nombre et à l'activité des flots; les cellules de Leydig apparaissent chargées de vacuoles lipidiques. Le développement des cordons se poursuit en longueur, tandis que leur diamètre change peu ( planche I fig 4 ).

Après la naissance, le tissu interstitiel subit une régression relative par rapport à l'accroissement de la surface tubulaire, régression qui s'annonçait déjà au 18e jour de la vie foetale. Les cellules de Leydig sont redistribuées en petits îlots disséminés ( planche I fig 6 ). Au centre des cordons on ne trouve pratiquement plus de gonocytes : certains ont dégénéré, d'autres ont migré vers la périphérie ( planche II fig 1 ).

La glande diastématique reprend un important développement après le 10e jour post partum ( planche II fig 4 ).

b) Etude histochimiqueIntroduction

Cette étude, menée parallèlement à l'étude histologique, est basée sur la recherche d'une enzyme indispensable au déroulement d'une étape clé de la biosynthèse des stéroïdes. Cette enzyme, la  $\Delta^5 - 3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase (  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D ), catalyse en effet la déshydrogénation des stéroïdes non saturés ayant un groupe OH en position  $3\beta$  ( D H A : déhydroépiandro - stérone , prégnénolone ). Le schéma suivant indique les réactions ( flèches 1 - 4 ) qui sont catalysées par la  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D dans la synthèse de la testostérone à partir de la prégnénolone :



Depuis les premiers travaux de SAMUEL et coll. ( 1951 ), la présence de  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D a été mise en évidence dans tous les tissus élaborant des hormones stéroïdes. Dans le testicule de Souris adulte et impubère, elle est localisée dans les cellules interstitielles ( RUBIN et coll. 1963, MAIER 1965 et COLLENOT 1969 ) et dans le tissu conjonctif du rete testis ( BAILLIE 1961 ).

La réaction  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D a été étudiée au cours du développement foetal et dans les jours qui suivent la naissance ( BAILLIE 1961, HITZEMAN 1962 ). Des traces d'activité non spécifique ( formation de monoformazan rose ) sont décrites dans la crête génitale dès le 11e jour. La réaction caractéristique ( dépôt de diformazan bleu ) apparaît dans les cellules de Leydig entre le 14e et le 15e jour selon la souche étudiée par ces auteurs. Elle augmente ensuite jusqu'à la fin de la gestation.

Dans le testicule foetal s'accomplissent donc certaines étapes de la biosynthèse des stéroïdes. Ceci confirme les résultats obtenus avec d'autres techniques mettant en évidence la présence de sécrétion androgène in vivo chez l'embryon de Souris. La castration précoce ( 13e - 14e jour ) empêche la masculinisation du tractus génital ( pas de régression des canaux de Müller, pas de morphogénèse des glandes annexes ) : les bourgeons mammaires de ces castrats se développent comme ceux des foetus femelles. L'injection de propionate de testostérone à la mère rétablit en partie la formation du tractus mâle chez les castrés ( RAYNAUD et FRILLEY 1950 ). L' injection d'un antagoniste de la testostérone ( cypro - térone ) permet une croissance mammaire de type femelle ( ELGER et NEUMANN 1966 ) chez le mâle.

Nous avons eu recours à la technique histo - enzymologique de WATTEN - BERG modifiée par LEVY pour notre étude de la gonade à partir de l'ébauche indifférenciée.

### Matériel et méthode

Le matériel expérimental utilisé est le même que celui dont nous avons donné la description au début de ce chapitre ( p. 22 ). Nous avons tenu compte des recommandations méthodologiques de BAILLIE et coll. ( 1966 ) en sup - primant le lavage des coupes à l'acétone, en évitant, lors du montage, de déshydrater les coupes aux alcools qui extraient une partie du diformazan ou risquent de le cristalliser ultérieurement. Nous avons constaté, comme différents auteurs le préconisent ( ARVY, COLLENOT, SCHEIB ), qu'une brève fixation à froid ( 0° ) des organes n'inhibe pas de façon préjudiciable l'activité mais préserve les tissus de modifications post mortem et donne des images histologiques beaucoup plus lisibles que les coupes fraîches collées et séchées sur lame. Les études biochimiques ont montré qu' in vivo et in vitro la réaction est couplée avec la présence d'une  $\Delta^5$  isomérase endogène qui déplace la double liaison sur le cycle A (  $DHA \longrightarrow \Delta^4$  - androstènedione et prégnénolone  $\longrightarrow$  progestérone ). Pour visualiser en histochimie la réaction d'oxydation, on fournit au tissu un cofacteur, la nicotinamide adénine dinucléotide ( NAD ), qui accepte l' H libéré et le cède, par l'intermédiaire d'une réductase, la  $NADH - TR^{(x)}$ , à un sel de

<sup>x)</sup> Cette réductase se retrouve dans différents autres tissus, elle intervient dans toutes les réactions de déshydrogénation en présence du cofacteur NAD.

ditétrazolium, le NBT ( nitro - blue - tetrazolium salt ) ajouté au milieu d'incubation. Ce sel, incolore et soluble sous sa forme oxydée, devient bleu et insoluble sous sa forme réduite; il se dépose aux endroits de la réaction ( fig 1 ). Le produit rosé qui résulte de l'oxydation partielle ( monoformazan ) d'un bout de la molécule de NBT est plus soluble et peu spécifique ( PEARSE 1960 ). Nous n'en avons pas tenu compte dans nos observations.

Toutes les manipulations sont faites à 0° et à pH 7.2 étant donné que la NAD est rapidement détruite en pH plus alcalin. Les organes prélevés sont immédiatement fixés 1 h 30 - 2 h dans une solution de formol commercial dilué 10 fois dans du tampon phosphate 0.1 M mono - et disodique, pH 7.2 . Après rinçage au tampon, les coupes à la congélation sont effectuées à 20  $\mu$  à l'aide du Kryomat Leitz ( - 15 ° ), puis incubées à 37° 1 - 2 h selon le stade du développement dans du substrat fraîchement préparé :

0.1 millimole de D H A, stéroïde en C<sub>19</sub>, ou de prégnénolone, stéroïde en C<sub>21</sub> .  
 0.16 millimole de N B T .  
 4 millimoles de nicotinamide.  
 0.54 millimole de N A D ( D P N ).  
 0.057 millimole de PO<sub>4</sub> .

Après incubation, les coupes sont récoltées et brièvement postfixées ( 30 - 50 min ) avant d'être rincées et montées à la glycérine en milieu aqueux. Les témoins sont incubés dans le substrat dépourvu de stéroïde.

### Résultats

Les gonades de 10 - 12 jours ne manifestent aucun signe d'activité  $\Delta^5-3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase, même après incubation prolongée. A partir du 12e jour, on voit apparaître les premiers grains de diformazan bleu dans le testicule en voie de différenciation ( incubation 2 - 2 ½ h ). Ces grains sont petits, isolés et répartis dans l'ensemble de la gonade où commencent à s'esquisser les cordons; à ce stade, dans les futures ovaires, aucune réaction n'est obtenue. Les coupes incubées sans stéroïde donnent également une légère réaction non spécifique ( très fine granulation éparse ); cette réaction n'a pas été obtenue aux stades ultérieurs ( planche IV fig 1 ).

A 12 ½ jours, les cordons sont ébauchés. Les grains de diformazan apparaissent partiellement groupés et sont localisés dans les cellules périphériques des cordons et dans les espaces interstitiels ( planche IV fig 3 ).

A 13 jours, la réaction s'est accentuée dans l'interstitielle, elle existe encore un peu dans les cordons sous forme de grains localisés vers le pôle basal des cellules ( planche IV fig 4 ).

A 14 jours, la réaction  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  est très intense et confinée aux seules cellules de Leydig; sa distribution sur les coupes incubées est analogue à celle des cellules fuchsinophiles sur les coupes histologiques. Les cellules qui réagissent ont un cytoplasme violacé où l'on distingue des amas de grains bleu-noirs. Les cordons, dont le diamètre a augmenté, sont entièrement négatifs ( planche IV fig 5 et 6 ).

Entre le 14e jour et la naissance ( 19e - 20e jour ), l'extension importante des tubes entraîne une redistribution des cellules interstitielles qui forment des travées et sont partiellement refoulées vers la périphérie. Cette répartition des îlots et l'existence de zones interstitielles dépourvues de cellules actives qui en découle donne un aspect plus hétérogène à la réaction  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$ . D'autre part, la réaction étant déjà très forte à 14 jours, on n'observe pas d'augmentation d'intensité appréciable au 16e jour.

Entre 18 et 20 jours, la densité des grains dans les îlots est encore plus forte qu'avant; toutefois la réaction globale à la naissance n'est pas accentuée de façon significative ( planche IV fig 2 et 3 ).

Dans les jours qui suivent la naissance, on assiste à une diminution relative de l'importance de la réaction  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  dans l'interstitielle. Cependant, il est difficile de savoir si cette diminution est réelle ou provoquée par l'essaimage des cellules interstitielles entre les tubes qui prolifèrent de façon considérable à ce moment-là. A côté de plages importantes de cellules histochimiquement actives, on trouve de plus en plus d'espaces pauvres ou dépourvus de telles cellules ( planche V fig 4 et 5 ).

Deux semaines après la naissance, ce phénomène est encore accentué. Les îlots de Leydig occupent surtout certains carrefours entre les cordons. La réaction  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  est localisée dans ces îlots, ainsi que dans certaines cellules fusiformes qui bordent les cordons ( planche V fig 6 ).

Chez l'animal pubère, l'activité  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  se manifeste à nouveau de façon importante dans le tissu interstitiel glandulaire dont les plages éparses sont réparties selon le mode de distribution que l'on trouve chez l'adulte.

REACTION HISTOCHIMIQUE

REACTION au NIVEAU du STEROIDE

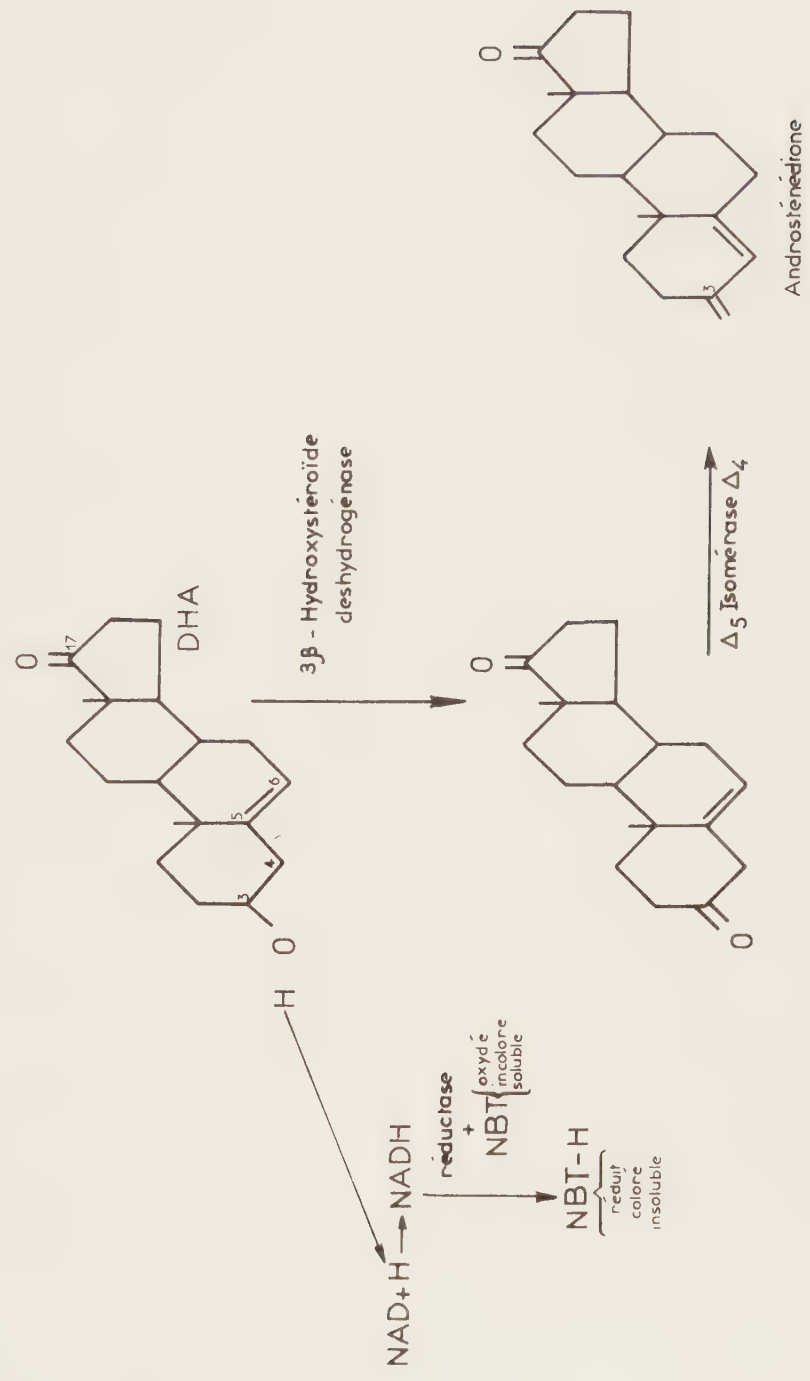


fig 1 Schéma illustrant l'action de la  $\Delta^5\text{-}3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase et de l'isomérase entrant en jeu.

## Discussion

Les informations que donnent les techniques histologiques et histo-chimiques permettent de tirer les conclusions suivantes concernant le développement in vivo du testicule de Souris depuis son ébauche indifférenciée.

Au moment où l'infiltration mésenchymateuse détermine dans la gonade génétiquement mâle les premiers signes de la différenciation sexuelle, l'activité de la  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  est visible à la fois dans les futurs espaces interstitiels et dans les ébauches des cordons. Cette activité précède donc de quelques heures l'apparition des premiers indices morphologiques de différenciation sexuelle mâle. Rappelons à ce propos les travaux de BRAMBELL ( 1928 ) puis de LINDH ( 1961 ) chez le Rat montrant qu'avant qu'aucun critère histologique ne permette de distinguer l'ovaire du testicule, il existe déjà un certain dimorphisme sexuel quant à la surface de section et au volume de la crête génitale ( tous deux supérieurs chez le futur mâle ). Du point de vue biochimique, une étape clé de la biosynthèse des stéroïdes peut donc être franchie entre le 12<sup>e</sup> et le 13<sup>e</sup> jour de la gestation, au moment de la morphogénèse des cordons; l'enzyme intervenant dans cette étape est présente à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des cordons.

Douze heures plus tard ( 13<sup>e</sup> jour ), des cellules très fuchsinophiles se distinguent dans les espaces interstitiels autour des cordons qui sont nettement délimités; à l'intérieur de ces derniers, certaines cellules en position périphérique présentent la même affinité tinctoriale du chondriome. Parallèlement, l'activité  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  a augmenté entre les cordons mais elle reste décelable à l'intérieur.

Les travaux de HART et coll. ( 1966 ) et BAILLIE et coll. ( 1966 ) ont mis en évidence, chez la Souris, la présence de différentes enzymes pouvant jouer un rôle dans la synthèse des androgènes, en dehors du tissu interstitiel proprement dit ( mésenchyme de l'ébauche génitale, tissu conjonctif du rete testis ). De plus, chez le Rat, les cellules de Sertoli, à l'âge adulte, se sont avérées capables de synthétiser des stéroïdes ( CHRISTENSEN et MASON 1965 ).

Au moment de la différenciation du testicule, la présence de  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  et de cellules fuchsinophiles dans les cordons est - elle en rapport avec l'origine des cellules de Leydig, ou bien certaines cellules des cordons ont - elles temporairement la possibilité de jouer un rôle glandulaire ? Comment et pourquoi cette possibilité disparaît - elle lorsque le tissu de Leydig entre dans une phase de

développement très intense ( 14e jour ) ? Les techniques histologiques et histoenzymologiques ne permettent pas de répondre à ces questions. Le fait que la cellule de Leydig en voie de différenciation n'ait pas encore acquis ses caractères distinctifs ( fuchsinophilie ou présence de quantité décelable de lipides osmiphiles ) pose évidemment un problème particulier.

Chez l'embryon, un jour avant la fin de la gestation, les cellules de Leydig qui, auparavant, remplissaient la quasi-totalité de l'espace interstitiel subissent une redistribution. Elles ont une activité mitotique réduite; ces phénomènes s'accroissent après la naissance. Cependant, la continuité de la lignée interstitielle demeure ininterrompue : les îlots se raréfient mais ne sont jamais dépourvus de cellules intensément fuchsinophiles ou  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  positives. Ces constatations confirment les travaux de BAILLIE ( 1961 ) qui a suivi l'évolution de l'interstitielle à l'aide de la réaction A.P.S. .

Dans nos conditions expérimentales cependant, la reprise d'activité du tissu de Leydig se manifeste au 16e jour post partum, c'est - à - dire 6 jours plus tôt que ne le signale BAILLIE dont les techniques histochimiques diffèrent légèrement des nôtres. Ce problème sera discuté à la lumière de notre étude en parallèle sur le développement hypophysaire.

Rappelons enfin que dans les tubes, le démarrage de la spermatogénèse suivi de l'entrée en méiose se fait pendant la période où l'activité de l'interstitielle est en veilleuse ( 6 - 7 jours post partum ).

## 2) Développement de l'hypophyse embryonnaire et prépubère.

### Introduction

Chez la Souris, le développement de la poche de Rathke a été étudié à partir du 9e jour de gestation, au moment où le tissu nerveux est en période de croissance rapide ( KERR 1946 ).

La jonction entre la paroi du stomodéum et le plancher diencéphalique peut être considéré comme point de départ du développement de la future hypophyse ( 10e jour ). Cette jonction résulte d'un mouvement d'évagination de l'épithélium de la cavité buccale en direction du diencéphale qui, lui, émettra un diverticule : le processus infundibulaire. La pars distalis s'ébauche à partir d'un épaississement stomodéal au niveau de la plateforme hypophysaire qui, en se repliant,

va permettre l'infiltration mésodermique.

Au 11e jour de gestation, la partie proximale de la poche de Rathke s'ouvre encore sur la cavité buccale.

Au 13e jour, avec la fermeture de la poche, se constitue la fente hypophysaire dont la paroi antérieure est composée de hautes cellules disposées en palissade sur un ou deux rangs.

Au cours du 14e jour, les cellules se multiplient activement, elles se groupent parfois " en rosette " et forment le parenchyme adénohypophysaire proprement dit. Un important réajustement tissulaire est à l'origine de l'épaississement de la paroi antérieure de la poche et de la déformation en S de la fente hypophysaire ( KERR 1946 ). L'arrangement des cellules en follicules se retrouve moins fréquemment; elles se disposent davantage en petits groupes de constitution irrégulière ( SANO et SASAKI 1969 ). Les mitoses sont très nombreuses en particulier en bordure de la fente. De là, les cellules migrent vers l'intérieur du parenchyme adénohypophysaire. Ce mouvement et ce remaniement tissulaire permettent au mésenchyme et à ses capillaires de pénétrer dans la partie antérieure où les capillaires forment de petits sinus presque toujours dépourvus de globules rouges.

Au 15e et au 16e jour, la fente hypophysaire prend son orientation antéro-postérieure définitive. Le volume de la pars distalis augmente beaucoup; certains des groupes cellulaires y sont maintenant délimités par du tissu conjonctif. Les capillaires sont beaucoup plus nombreux et la circulation sanguine s'y est établie.

Les techniques de coloration à l'hématoxyline ferrique et au Mallory ( KERR 1946 ) ont permis de distinguer les premières granulations dans les cellules acidophiles, au 17e jour, et de visualiser la différenciation des basophiles entre le 17e et le 18e jour. A ce stade du développement, l'hypophyse foetale de Souris ne diffère plus morphologiquement de l'hypophyse adulte; la fréquence des mitoses diminue considérablement dans le lobe distal; elle augmentera à nouveau après la naissance.

Le travail que nous avons entrepris porte sur le développement histophysio- logique et histochimique du parenchyme antéhypophysaire et en particulier sur l'évolution des cellules responsables de la fonction gonadotrope.

## Matériel et méthode

Les hypophyses sont fixées au Bouin Hollande sublimé pendant 3 - 7 jours selon l'âge; les pièces sont ensuite rincées quelques heures dans une solution de carbonate de lithium à saturation puis stockées dans l'acool à 70° avant de passer successivement dans 3 bains d'alcool butylique, puis dans un bain de mélange à 50 % alcool butylique - paraffine, précédant l'emparaffinage proprement dit. Les coupes sont effectuées à 3 - 4  $\mu$  et montées en série.

La coloration au bleu d' Alizarine acide de HERLANT ( 1960 ) a été adoptée pour l'étude histologique; cette coloration permet de distinguer diverses catégories cellulaires " basophiles " de la pars distalis. D'autre part, elle met en évidence les cellules à LH fortement érythrosinophiles, les différenciant des autres " acidophiles " qui apparaissent jaunes ou jaune - oranges.

La réaction à l'acide periodique Schiff de McManus Hotchkiss adaptée par HERLANT ( 1949 ) puis par PURVES et GRIESBACH ( 1951 ) pour le tissu adénohypophysaire a servi à l'étude histochimique. Elle caractérise, dans ce cas, des cellules telles que les gonadotropes dont le produit de sécrétion comprend une composante glycoprotidique.

Après 30 - 40 min dans le réactif de Schiff <sup>x)</sup>, nous avons, suivant les indications de RACADOT ( communication personnelle ), eu recours à un rinçage des préparations à l'eau tiède, suivi d'une très brève contre - coloration des noyaux à l'hémalun.

## Résultats

A 12 ½ jours, l'ébauche adénohypophysaire comprend des cellules indifférenciées A. P. S. négatives qui se divisent activement; leur cytoplasme est peu abondant, leur noyau assez petit, riche en grains de chromatine très dense ( planche VI fig 1 ). C'est le stade de la différenciation sexuelle de la gonade; le tissu interstitiel du testicule acquiert un certain équipement enzymatique nécessaire à la biosynthèse d'androgènes.

Dès le 15e jour, les premières cellules A. P. S. positives apparaissent dans la pars distalis; certaines sont piriformes et ont un gros noyau entouré par un cytoplasme abondant; d'autres ont un noyau plus petit, plus dense, et un cytoplasme plus allongé ( planche VI fig 2 ). A ce moment on voit apparaître la

<sup>x)</sup> Préparé selon la méthode de M. - C. SABINE.

formation caractéristique des structures " en rosette " dans l'adénohypophyse. La rareté des vaisseaux sanguins et surtout l'absence quasi totale de globules rouges à l'intérieur font penser que si l'élaboration d'hormones glycoprotidiques s'effectue déjà dans certaines cellules elle ne peut probablement pas être déversée dans la circulation. Le tétrachrome de Herlant ne révèle pas d'affinité tinc-toriale spécifique. Au niveau du testicule, rappelons qu'à ce stade le tissu inter-stitiel entre dans une période de croissance explosive et d'activité enzymatique très intense.

Au 16e jour, les cellules A. P. S. positives sont un peu plus nombreuses, elles sont souvent groupées autour des vaisseaux qui se sont développés et renferment davantage d'érythrocytes.

Les premières cellules cyanophiles au bleu de Toluidine se distinguent dans le parenchyme, en particulier dans la zone dite " sexuelle " ( jonction avec la pars intermedia ). Dans la gonade mâle, les cordons sont bien développés et contournés; l'interstitielle est très abondante et bourrée de grains fuchsinophiles ( planche I fig 3 et 4 ). Comme nous le verrons plus loin, le dosage du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes révèle à cet âge l'apparition de traces de FSH ou de LH.

Entre le 18e jour et la mise bas, les cellules basophiles sont en majorité A. P. S. négatives, elles ont un cytoplasme clair et hypertrophié ( dégranulé ) et un noyau très excentrique ( planche VI fig 3 et 4 ). On peut se demander si cet aspect reflète un état d'hyperactivité dû à une diminution du taux d'androgènes circulant, ce qui laisserait supposer que la rétroaction s'était établie déjà antérieurement; en effet, par rapport aux stades précédents, le tissu interstitiel du fœtus à terme semble entrer dans une période d'activité globale réduite ( planche I fig 6 ). Il se peut également que les cellules gonadotropes hypophysaires ayant excrété leur produit de sécrétion offrent temporairement un aspect A. P. S. négatif à la fin de la gestation ( planche VIII fig 1 ). Cette période correspond d'ailleurs à une diminution du nombre des cellules gonadotropes colorées en bleu - clair par le tétrachrome de Herlant; elle se prolonge jusqu'au 5e jour post partum.

Au 6e jour, la réaction A. P. S. réapparaît dans de très nombreuses cellules à gros noyau et cytoplasme bien développé. Ces cellules sont presque toujours groupées autour d'un vaisseau ou d'un capillaire ( planche VI fig 6 et planche VIII fig 2 ).

L'activité mitotique qui avait diminué considérablement peu avant la naissance reprend entre le 6e et le 7e jour ( planche VII fig 1 ).

Au cours de la deuxième semaine, les plages gonadotropes contiennent déjà des cellules dont l'aspect indique qu'elles ont des cycles sécrétoires asynchrones ( cellules en phase de stockage voisinant avec les cellules dégranulées excrétrices. Planche VII fig 2 et 3 et planche VIII fig 3 et 4 ). Ces phénomènes s'accroissent ensuite au fur et à mesure que la taille des cellules gonadotropes augmente ( planche VII fig 4, 5 et 6 et planche VIII fig 5 et 6 ).

En parallèle avec cette étude histologique et histochimique, nous avons effectué des dosages chronologiques du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes. Les méthodes de dosage utilisées ont servi également à notre étude chez le Rat; ces techniques méritant d'être détaillées quelque peu, nous avons été amenée à regrouper nos résultats concernant le contenu hypophysaire en gonadotropes au chapitre IV. L'interprétation des observations histochimiques que nous venons d'exposer sera de ce fait traitée dans la discussion du chapitre IV .



## C h a p i t r e   I I

### EVOLUTION PONDERALE DES GONADES ET DE L ' HYPOPHYSE .

#### ETUDE POST PARTUM .

##### A) Croissance normale chez le Rat, de la naissance à la puberté .

#### Introduction

Une étude de la croissance pondérale et volumétrique de la gonade du Rat embryonnaire a été effectuée par ROOSENRUNGE et ANDERSON ( 1959 ) puis reprise en détail par LINDH ( 1961 ). Cet auteur constate que la vitesse de croissance des gonades diminue au moment où la différenciation sexuelle est amorcée, ce qu'il attribue à un ralentissement de la prolifération cellulaire dû au processus de différenciation ( phénomène observé sur d'autres tissus en développement, cf. KALLEN 1958, BERNFIELD et FELL 1967 ).

Après la naissance, PRICE et ORTISZ ( 1944 ), étudiant la sensibilité de la gonade mâle aux stéroïdes sexuels ou aux gonadostimulines, ont rapporté des données concernant l'évolution pondérale du testicule de 4 en 4 jours entre le 6e et le 18e jour. Dans leur travail, ROOSENRUNGE et ANDERSON ( 1959 ) observent une croissance régulière de la gonade mâle entre le 5e et le 21 e jour post partum.

Dans le but de déterminer quelles sont, au cours de l'évolution post natale, les étapes présentant un intérêt particulier, nous avons entrepris l'étude systématique de la croissance pondérale 1°) du testicule telle qu'elle a été effectuée par LINDH chez l'embryon, 2°) de l'hypophyse ( dont on sait depuis CLARK 1935b, PFEIFFER 1936, puis LIBMAN 1953, SIPERSTEIN 1955 et MAQUEO et coll. 1966 qu'elle présente dès la fin de la première semaine des signes d'activité ), 3°) des glandes annexes ( il a été démontré depuis WIENER 1935 et PRICE 1936 et 1944 que leur croissance dépend principalement des androgènes testiculaires ).

### Matériel et méthode

Nous avons prélevé les glandes de 225 jeunes Rats de souche Wistar, issus de mères provenant du même élevage et dont la lignée remonte à 25 ans; ces mères vivent dans des conditions identiques à celles décrites précédemment pour les Souris Swiss. Les animaux ont été sacrifiés au chloroforme et les pesées se font à intervalles de 24 h, du 2e au 21e jour, puis au 23e et au 25e jour. Nous avons ainsi une moyenne de 10 mesures par point, groupant en général les Ratons de 4 - 5 nichées différentes. Les organes prélevés à l'autopsie sont rapidement pesés à l'aide d'une balance " Mettler " de précision 0.01 mg, puis fixés pour l'étude histologique. D'autre part, nous avons mesuré quotidiennement le poids corporel d'un grand nombre d'animaux à partir de leur naissance, ce qui porte à 35 mesures par âge le nombre moyen des poids du corps relevés.

L'analyse statistique des résultats a été effectuée par la méthode de Gauss dont l'application se justifie par le fait que, pour chaque valeur moyenne, environ 70 % des mesures sont distribuées à l'intérieur de l'écart - type.

### Résultats

Cette étude a fait l'objet d'un mémoire ( LOMBARD - DES GOUTTES 1966a ) où figure l'analyse détaillée des résultats que nous résumons ici schématiquement :

Testicule : La courbe de poids testiculaire montre une croissance très régulière à l'exception d'un arrêt entre le 17e et le 20e jour ( voir fig 3 a et b ).

**Hypophyse :** Le poids hypophysaire ( fig 2 ) augmente régulièrement jusqu'au 6e jour ( 1.03 mg ) puis très peu jusqu'au 12e jour ( 1.15 mg ); il augmente ensuite beaucoup pour atteindre 1.55 mg au 17e jour. Du 17e au 20e jour, on enregistre une chute de poids ( 1.4 mg ) puis la croissance reprend très rapidement.

Etant donné l'évolution très régulière des testicules, le rapport du poids hypophyse / testicule met en évidence deux points particuliers au cours de la croissance hypophysaire : son poids relativement fort à l'âge de 6 jours et relativement faible entre le 10e et le 12e jour.

**Les glandes annexes :** Elles ont une croissance régulière jusqu'au 16e jour; le développement pondéral de la prostate ventrale est beaucoup plus lent que celui des vésicules séminales; il n'est marqué par une période de croissance rapide qu'après le 20e jour. La courbe de poids des vésicules séminales accuse un palier bien marqué entre le 17e et le 21e jour ( fig 4 ).

### Discussion

En confrontant les résultats de LINDH ( 1961 ) chez l'embryon et ceux que nous obtenons à partir de la naissance, on constate qu'au ralentissement de croissance gonadique qui accompagne la période de différenciation du testicule ( 15e jour de gestation ) fait pendant un arrêt temporaire de l'augmentation pondérale du testicule à l'époque du présevrage ( 17e jour post partum ). Cet arrêt correspond en quelque sorte à une différenciation de second ordre : c'est précisément au milieu de la 3e semaine que SAPSFORD ( 1962 ) observe, d'une part, la transformation graduelle des spermatogonies de type A immatures en spermatogonies A adultes, d'autre part, la différenciation des cellules somatiques ( ou petites cellules épithéliales ) en cellules de Sertoli ( accroissement de leur surface nucléaire, diminution de la taille des grains de chromatine et de la chromophilie de leur cytoplasme ). Seule une étude autoradiographique systématique telle qu'elle a été effectuée chez l'adulte par CLERMONT et coll. ( 1959 ) portant sur les étapes de cette période du présevrage permettrait de confirmer l'hypothèse d'une relation directe entre la différenciation cellulaire et l'élongation de la phase intermitotique. L'étude de l'incorporation de la thymidine tritiée dans le testicule du Rat impubère n'a été effectuée par NIEMI et KORMANO ( 1964 ) et STEINBERGER et STEINBERGER ( 1965 ) que de 4 en 4 jours, ce qui n'apporte pas d'informations suffisamment détaillées sur la période du présevrage.

Bien que le tissu interstitiel soit généralement considéré comme un facteur peu important du développement pondéral testiculaire ( ROOSENRUNGE et LEIK 1968 ), il faut signaler que c'est précisément au 17<sup>e</sup> jour que la glande diastématique reprend une importante activité histochimique ( NIEMI et KOR - MANO 1964 ) et mitochondriale ( LOMBARD - DES GOUTTES 1966 ). Ce développement fait d'ailleurs suite à une augmentation temporaire au 11<sup>e</sup> jour du nombre de cellules hypophysaires sécrétant les facteurs FSH et LH ( SIPER - STEIN 1955, LOMBARD - DES GOUTTES et SCEMAMA 1966 ); or nous avons constaté, à 11 jours précisément, une chute du poids de l'hypophyse. Il n'est pas exclu que ce phénomène aille de pair avec une différenciation hypophysaire. Chez l'embryon également, le ralentissement de croissance testiculaire survient à l'époque de l'apparition de la réaction enzymatique de la  $\Delta^5$ - $3\beta$ -HSD dans l'interstitielle ( NIEMI et IKONEN 1961, CHIEFFI et coll. 1964, PICON 1967 ).

Contrairement à ce qui se passe chez l'embryon ( LINDH 1961 ), un léger ralentissement de la croissance corporelle a été enregistré également au moment du palier du développement testiculaire postnatal. Il est donc possible que cette période de crise soit la conséquence de nombreux phénomènes dont certains sont liés au présevrage lui - même ( diminution de la quantité ou de la qualité du lait fourni par la mère ou déséquilibre temporaire dans le développement du jeune Rat : déficience anabolique ou excès catabolique ).

Le ralentissement de la croissance hypophysaire observé également entre le 17<sup>e</sup> et le 21<sup>e</sup> jour pourrait avoir un rôle dans la crise du présevrage au niveau des testicules et des vésicules séminales. SIPERSTEIN ( 1955 ) constate un accroissement marqué de l'intensité de la réaction A. P. S. positive dans l'hypophyse à la fin de la 3<sup>e</sup> semaine. Nous avons pu confirmer ces observations histologiques qui parlent en faveur d'une étape de stockage et peut-être aussi de différenciation accrue des cellules gonadotropes au moment du sevrage, époque du ralentissement de la croissance pondérale.

Ces dernières constatations permettent de conclure qu'au cours du développement postnatal du tractus génital chez le Rat, tout se passe comme si une concordance étroite était déjà établie entre l'évolution du testicule et de la glande pituitaire. Les premiers signes de cette concordance précoce ont été fournis par les expériences de castration à la naissance qui font l'objet de la dernière partie de ce chapitre.

Avant d'aborder cette partie nous examinerons brièvement, à titre de comparaison, la croissance pondérale des gonades et de l'hypophyse chez la Souris, ceci afin de voir si certaines étapes caractéristiques se retrouvent chez une espèce voisine.

#### B) Comparaison avec la Souris.

Une étude de la croissance gonadique chez l'embryon de Souris a été effectuée à l'aide des méthodes planimétriques par BRAMBELL ( 1928 ); elle ne révèle pas, comme chez le Rat, de ralentissement marqué de la croissance en rapport avec les processus de différenciation qui se déroulent particulièrement rapidement chez la Souris ( MINTZ 1960 ).

Les données pondérales que nous avons recueillies dans un certain nombre de cas au cours du dernier quart de la vie intra - utérine nous permettent de confirmer la prise de poids régulière du testicule au moins jusqu'au 17e - 18e jour.

Après la naissance, WIDMAIER ( 1963 ) a mesuré l'augmentation de la surface de section testiculaire chez la Souris; ses courbes montrent une croissance régulière mais faible entre le 2e et le 13e jour, puis un palier jusqu'au 17e jour, suivi d'une très forte augmentation jusqu'au 20e jour, époque précisément où, chez le Rat, la croissance paraît arrêtée.

Rappelons à ce propos qu'en comparant le développement postnatal histologique du testicule chez le Rat et la Souris, on constate que les processus évolutifs se déroulent parallèlement mais avec un décalage chronologique de 3 - 4 jours. On constate ici encore, que la croissance testiculaire marque un palier 3 - 4 jours plus tôt chez la Souris .

Les travaux de BAILLIE ( 1961 ), puis d' ICHIHARA ( 1969 ), de même que les mesures que nous avons effectuées, confirment la très forte augmentation de poids et de volume du testicule de Souris à partir du 20e jour mais ne révèlent par contre aucun palier marqué au cours des jours qui précèdent.

Le développement pondéral hypophysaire est rapide chez la Souris entre la naissance et le 6e jour, ce qui confirme les données rapportées par KERR ( 1946 ) sur l'index mitotique dans les jours qui suivent la naissance, puis légèrement ralenti jusqu'au 15e jour sans que l'on puisse parler de palier réel. Il reprend ensuite très régulièrement jusqu'à la puberté.

Ici encore un certain parallélisme apparaît entre le ralentissement de croissance hypophysaire correspondant histochimiquement à la réapparition de la réaction A. P. S. positive dans le parenchyme adénohypophysaire et le ralentissement de la croissance testiculaire.

Chez la Souris, comme chez le Rat, la croissance hypophysaire passe par une période critique correspondant à une phase de stockage des gonadotropes après le 6e jour; les dosages du contenu hypophysaire au cours du développement nous ont permis d'évaluer l'importance de ce stockage ( voir chapitre IV ). Cette période critique s'établit au moment de l'époque dite de différenciation du système hypothalamo - hypophysaire ( 6e jour ), elle coïncide avec une phase d'involution relative du tissu interstitiel de Leydig et avec l'apparition des premiers spermatocytes ( 6e - 7e jour chez la Souris, 10e - 11e jour chez le Rat ).

#### C) Effets de la castration pratiquée à la naissance chez le Rat.

##### Introduction

Depuis les travaux de CLARK ( 1935 ), on sait que l'hypophyse du Rat mâle castré à la naissance contient davantage de gonadotropines dès la 3e semaine. L'existence d'un "feed - back" gonado - hypophysaire était ainsi démontrée chez le Rat impubère pour la première fois.

En 1936, PFEIFFER a prouvé la sensibilité précoce de l'hypophyse aux sécrétions testiculaires et sa " différenciation " dans le sens mâle au cours des 5 premiers jours post partum : en l'absence d'androgènes, l'hypophyse reste du type bipotentiel et peut être " induite " dans le sens femelle ( transplantation d'ovaire pubère à un mâle castré à la naissance ). L'auteur conclut à une différenciation sexuelle secondaire non génétique de l'hypophyse. MOORE et PRICE ( 1938 ) obtiennent une diminution du poids testiculaire après administration de testostérone chez le Raton avant le 15e jour. Ils attribuent ce fait à une augmentation du " feed - back " hypophysaire due à l'injection d'hormones androgènes. HARRIS et JACOBSON ( 1952 ), puis BARRACLOUGH et GORSKI ( 1961 ), ont démontré que c'est par l'intermédiaire de l'hypothalamus que les stéroïdes interviennent dans la différenciation sexuelle hypophysaire. MAQUEO et KINCL ( 1964 ) inhibent le développement testiculaire et stérilisent définitivement

des Rats moyennant une injection d'oestradiol au 5e jour. LIBMAN ( 1953 ) a décelé dès l'âge de 7 jours les signes d'une réponse hypophysaire à la castration ( hypertrophie des cellules cyanophiles, apparition d'un appareil de Golgi négatif dans les cellules de type gonadotrope ).

Selon NEUMANN et coll. ( 1968 ), chez le Rat impubère, le développement pondéral des gonades et des glandes annexes est accéléré par un traitement à HCG ou PMS. Une administration simultanée de cyprotérone, un stéroïde anti - androgène, bloque la stimulation des glandes annexes et fait apparaître des figures de dégénérescence dans l'épithélium germinatif mais n'affecte pas ( ou peu ) le poids des testicules et l'activité de l'interstitielle.

Enfin FORSBERG et coll. ( 1968 ) ont montré que des effets similaires à ceux provoqués par la castration à la naissance sont observés après administration de cyprotérone en fin de gestation et au cours des premiers jours post partum.

L'importance de la période " périnatale " dans la détermination sexuelle de l'axe hypothalamo - hypophysaire et le développement du tractus génital a été mise en évidence par de nombreux auteurs dont les travaux ont confirmé et complété les résultats de PFEIFFER et ceux de MOORE et PRICE. DONOVAN et HARRIS et CAMPBELL ( 1966 ) ont récemment passé en revue l'ensemble de la question.

Dans le même contexte nous avons étudié les effets de la castration et de l'hémicastration pratiquée à la naissance chez le Rat mâle sur le développement des glandes endocrines et des glandes annexes.

### Matériel et méthode

Nous avons effectué deux sortes d'opérations sur des Rats mâles, de souche Wistar, le jour de leur naissance : 1) des castrations unilatérales ( 64 cas); 2) des castrations bilatérales ( 68 cas ); 74 animaux ont servi de témoins.

Les opérations se font sous anesthésie à l'éther et les testicules prélevés sont fixés en vue de l'étude histologique. Les témoins sont toujours les frères des opérés et la plupart du temps, castrats, hémicastrats et témoins proviennent des mêmes nichées.

Les jeunes Rats sont sacrifiés et autopsiés aux différents âges suivants : 4j., 5j., 6j., 8j., 10j., 11j., 13j., 16j., 17j., 19j., 21j., 25j. et 30j.

Les organes suivants sont prélevés et pesés à la balance " Mettler " ( précision 0.01 mg ) avant d'être fixés pour l'étude histologique : épiphyse, hypophyse, testicule ( s'il y a lieu ), vésicules séminales, prostate, surrénales, thymus et thyroïdes.

## Résultats

### A. Castration unilatérale

Chez les hémicastrats, l'hypertrophie compensatrice est nette dès l'âge de 4 jours, elle est constamment significative et va en s'accroissant avec le temps. En effet, la fig 3 a, qui représente l'évolution du poids testiculaire moyen chez les témoins (  $T_{\text{tém}}$  ) et chez les hémicastrats (  $T_{\text{hém}}$  ) en échelle logarithmique, montre que leur différence est sensiblement constante,

$$\log ( T_{\text{hém}} ) - \log ( T_{\text{tém}} ) = \text{constante} ,$$

résultat qui signifie que le rapport  $T_{\text{hém}} / T_{\text{tém}}$  est lui aussi à peu près constant. Ceci implique qu'en valeur absolue la différence  $T_{\text{hém}} - T_{\text{tém}}$  augmente avec le temps ( fig 3 b ).

Les vésicules séminales ( fig 4 ) subissent après l'opération un certain retard de croissance par rapport aux témoins. Cependant, sous l'influence, sans doute, du seul testicule hyperactif, leur développement redevient normal dès le 17e jour. Les différences observées au - delà de 17 jours sont compatibles avec les variations individuelles.

La prostate ventrale des hémicastrats n'accuse pas de différences pondérales très nettes par rapport aux témoins ( fig 5 ). Il en est de même de l'hypophyse ( fig 6 ).

### B. Castration bilatérale

Les vésicules séminales ( fig 4 ) prennent après castration totale un important retard de croissance dès l'âge de 5 jours par rapport aux témoins, retard qui va en s'accroissant beaucoup avec le temps. Ce résultat prouve combien, dès le début de son développement, la vésicule séminale dépend étroitement du taux d'hormones androgènes circulant .

La prostate également ( fig 5 ) paraît réagir assez vite à la castration : son poids reste nettement inférieur, dès le 5e jour, à celui des témoins. L'écart

est moins grand que dans le cas des vésicules séminales, ce qui montre que la prostate infantile est moins dépendante du taux d'androgènes testiculaires. A partir du 21<sup>e</sup> jour, sa croissance reprend, sous l'influence d'un facteur stimulateur endocrinien extérieur aux testicules, vraisemblablement surrénalien ( BURRILL et GREEN 1939 ).

Le poids hypophysaire des castrats bilatéraux ( fig 6 ) est considérablement augmenté dès le 6<sup>e</sup> jour et cette différence pondérale par rapport aux témoins se maintient jusqu'au 30<sup>e</sup> jour.

Surrénales, thymus, thyroïdes et poids du corps ne sont affectés significativement par la castration à aucun des âges étudiés.

### Discussion

L'hypertrophie compensatrice du testicule provoquée par la castration unilatérale est un phénomène connu depuis longtemps. Nos résultats montrent qu'elle est nettement décelable dès l'âge de 4 jours post partum. En ce qui concerne le poids du testicule hypertrophié, le pourcentage d'augmentation par rapport aux témoins est à peu près constant, il croît légèrement entre 10 et 20 jours. Sa valeur se situe entre 40 - 60 %, ce qui est en bon accord avec les résultats de GREEP ( 1961<sup>1</sup> ), chez l'adulte.

La castration bilatérale a un effet particulièrement marqué sur les vésicules séminales dont le développement est pratiquement bloqué dès l'âge de 5 jours. Par contre, la réponse de la prostate semble différente. Bien que son développement pondéral soit freiné par la castration bilatérale, les courbes de poids témoins et castrats sont, en gros, parallèles jusqu'à l'âge de 11 jours. A 21 jours, la prostate des castrats amorce une reprise de croissance qui se poursuit jusqu'au 30<sup>e</sup> jour, ceci malgré l'absence d'hormones androgènes testiculaires ( ce qui indique à ce moment l'intervention d'une influence stimulatrice extérieure aux gonades ). Ceci confirme les résultats de PRICE ( 1936, 1944 ). Il est intéressant de rappeler que KINCL et coll. ( 1963 ) observent un phénomène similaire après injection d'oestradiol à des Rats de 5 jours : l'inhibition du développement des vésicules séminales est nettement plus prononcée que dans le cas de la prostate. D'autre part, l'effet de la castration sur la prostate au niveau des mitochondries a été étudié par EDELMAN et coll. ( 1963 ); ils observent que la castration entraîne une diminution du nombre de mitochondries, l'activité

enzymatique par mitochondrie n'étant pas modifiée de façon significative.

L'hypophyse du castrat bilatéral, privée de " feed - back " androgénique, acquiert dès le 4e jour, et garde par la suite, un poids supérieur à la normale. LIBMAN et JOST ( 1953 ) ont montré que les premières altérations cyanophiles chez le Rat castré à la naissance apparaissent dès l'âge de 7 jours. Elles deviennent très nettes à 15 jours. Les modifications du contenu hypophysaire en gonadotrope induites par la castration à la naissance seront discutées au chapitre IV. Nos résultats montrent une augmentation moyenne du pouvoir gonadotrope hypophysaire chez l'animal castré à la naissance inférieure de 20 % à celle obtenue par CLARK ( 1935 ) dans les mêmes conditions expérimentales ( 80 % d'augmentation au lieu de 100 % ).

La castration unilatérale a des effets beaucoup moins nets sur le développement des glandes annexes et de l'hypophyse. Les fig 4, 5 et 6 montrent clairement que les courbes de croissances pondérales des hémicastrats se situent entre celles des témoins et celles des castrats, tout en demeurant plus proches des courbes des témoins et se confondant avec elles à partir de 16 - 17 jours. Ainsi les vésicules séminales accusent d'abord un léger retard de croissance systématique, bien que les différences avec les poids témoins ne soient jamais significatives. Dès 16 jours, cette différence disparaît. La prostate présente un comportement analogue. Ceci montre que, bien que le testicule de l'hémicastrat soit moins lourd que les deux testicules témoins ensemble ( l'hypertrophie n'est que de 40 - 60 % ), son activité est néanmoins suffisante pour assurer un développement pratiquement normal des glandes annexes.

La castration n'affecte pas l'évolution du poids corporel aux âges étudiés, résultat en accord avec ceux de GRUNT ( 1964 ) mais différent de ceux de LIBMAN ( 1953 ) qui signale un poids en moyenne inférieur chez les jeunes castrats. Il en est de même des surrénales, du thymus et des thyroïdes.

En résumé, cette étude du développement pondéral du système endocrinien après castration unilatérale et bilatérale à la naissance met en évidence l'existence de relations très précoces entre l'hypophyse, le testicule et les glandes annexes.

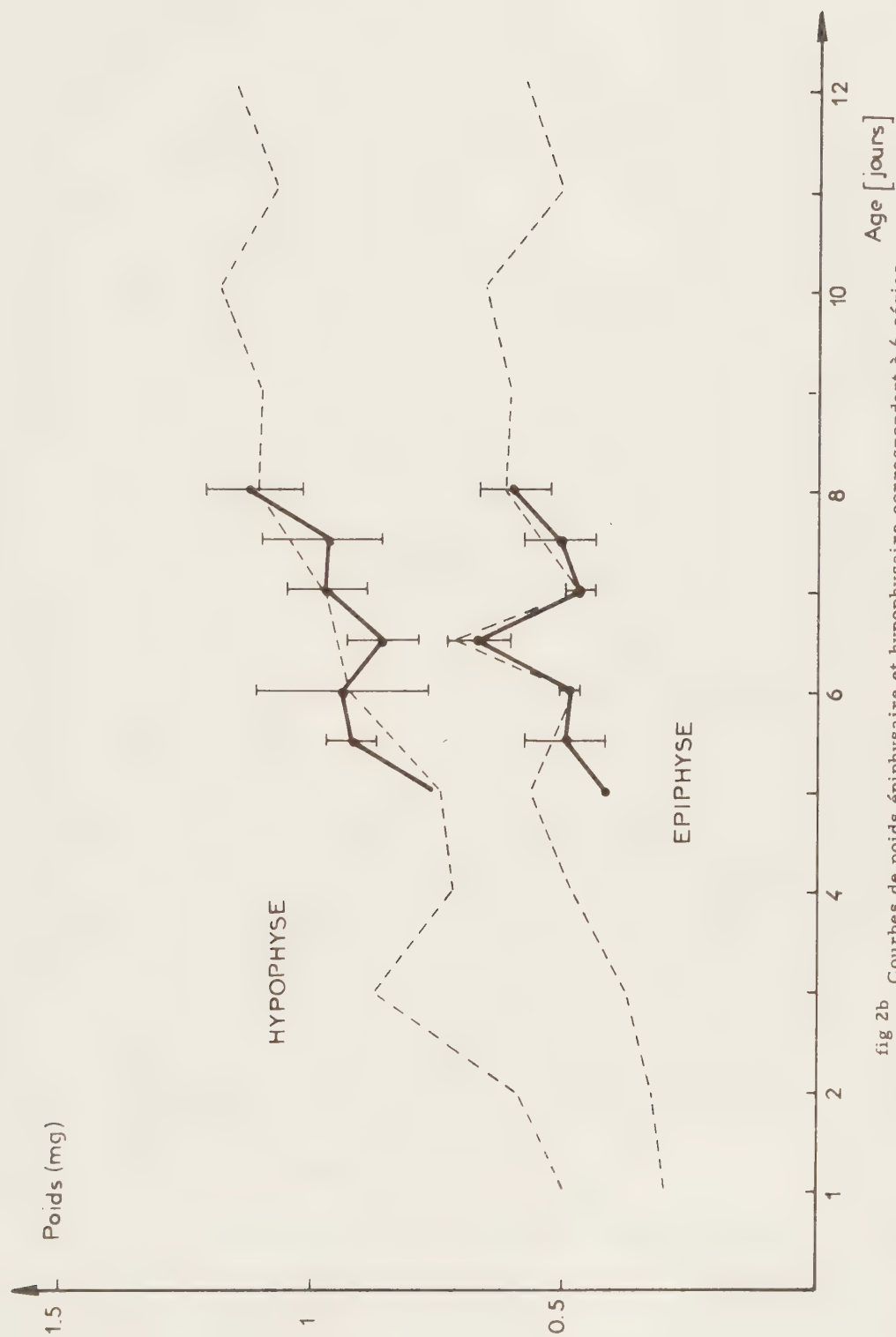


fig 2b Courbes de poids épiphysaire et hypophysaire correspondant à 6 séries de mesures effectuées toutes les 12 h, les animaux de chaque série provenant d'une même nichée. Ceci met bien en évidence la forte augmentation du poids épiphysaire entre 6 et 6 ½ jours. Les courbes en trait pointillé correspondent à l'ensemble des mesures effectuées à intervalles de 24 h (env. 15 cas par âge). Les barres représentent l'erreur-type.

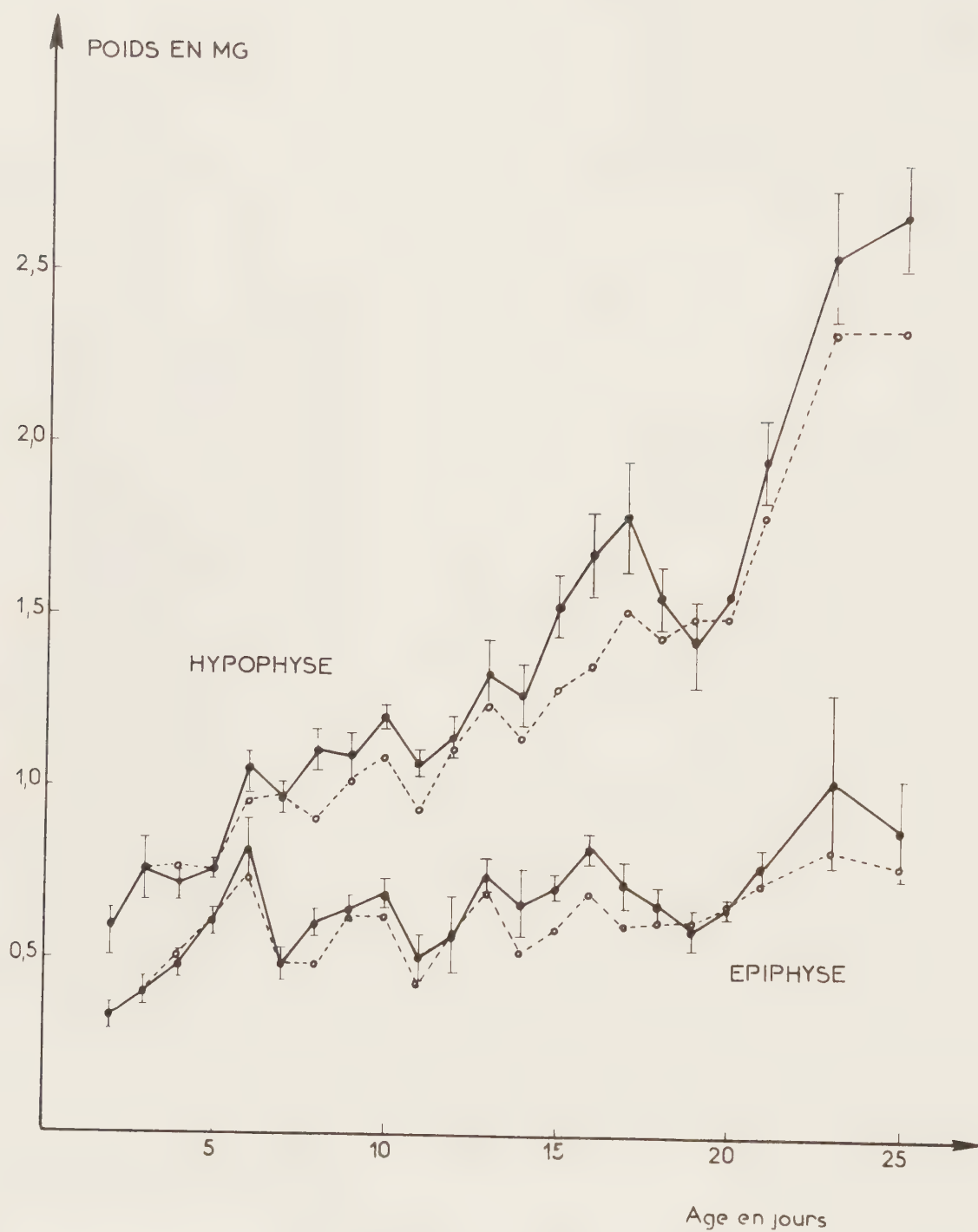


fig 2a Courbes de croissance hypophysaire et épiphysaire chez le Rat mâle. La courbe en pointillé correspond à la moyenne des poids relatifs au poids du corps multipliée par le poids moyen corporel. Les barres représentent l'erreur-type.

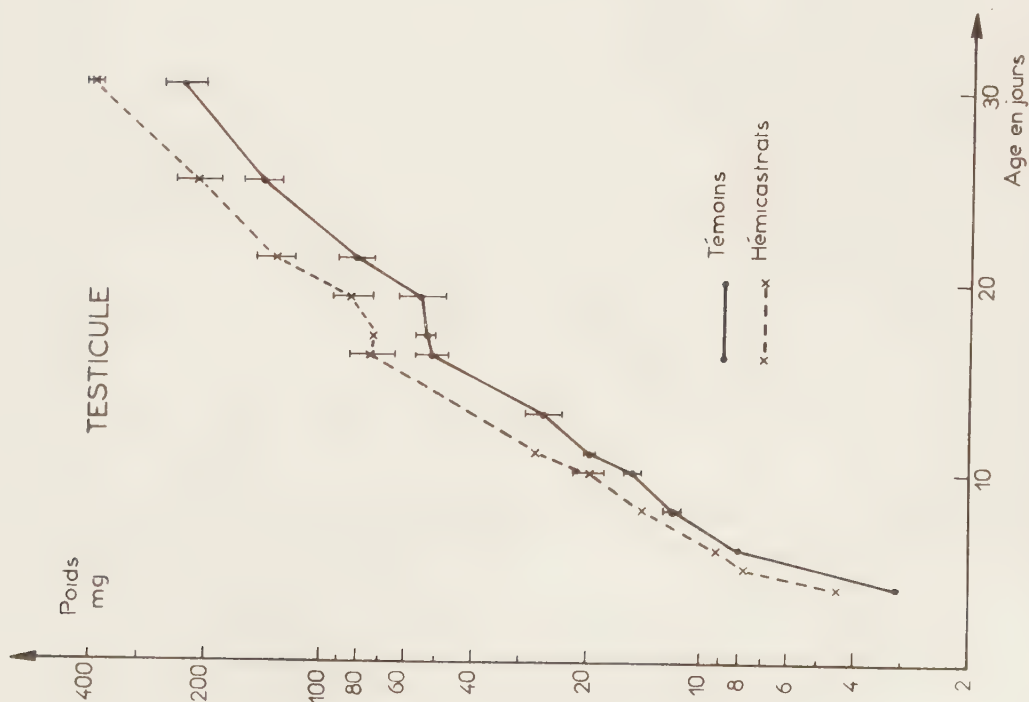


fig 3a Développement pondéral du testicule chez le Rat mâle témoin ( trait plein ) et hémicastré à la naissance ( trait pointillé ). Echelle logarithmique. Les barres représentent l'erreur-type.



fig 3b Même légende que pour la fig 3a. Echelle linéaire.

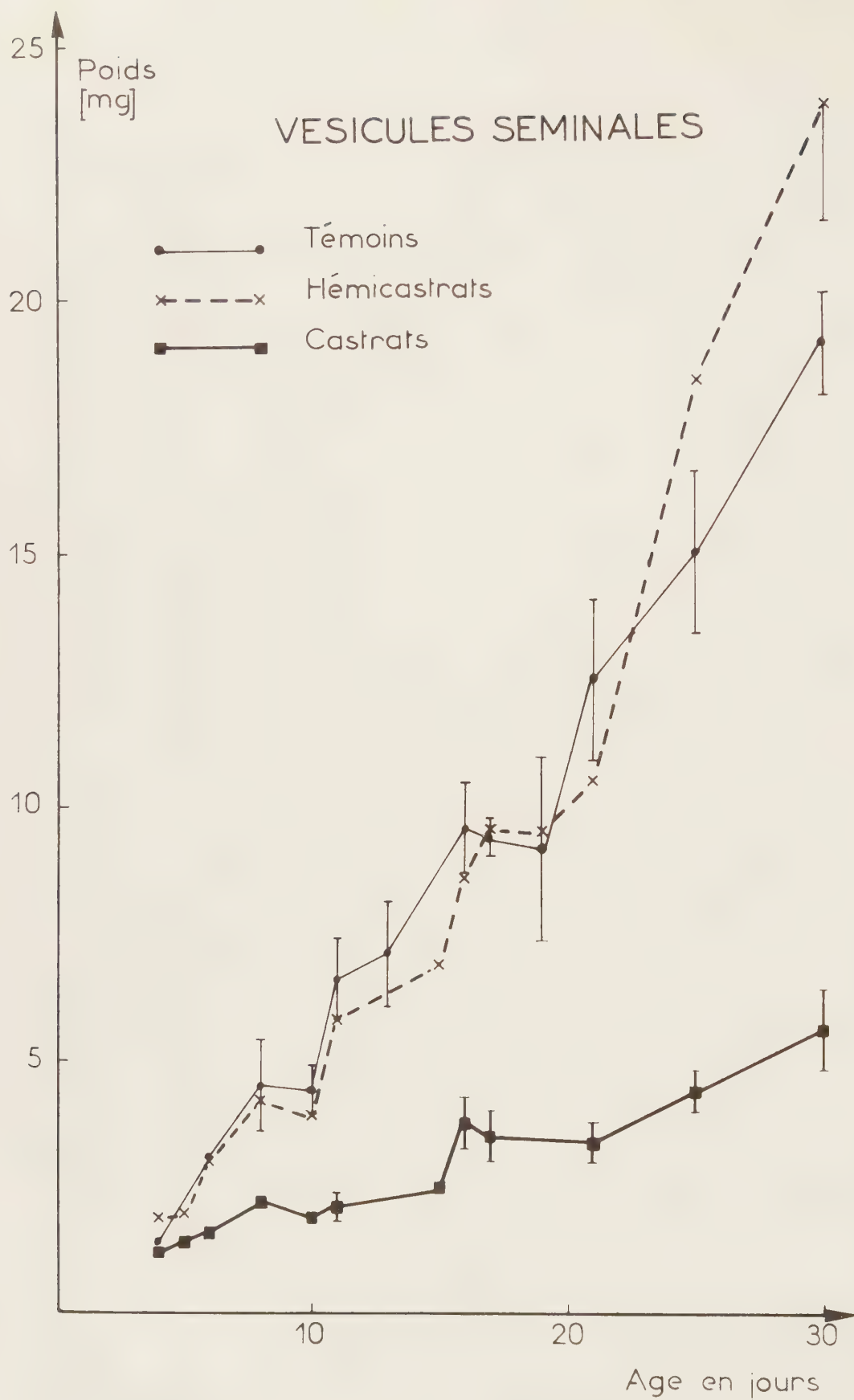


fig 4 Développement pondéral des vésicules séminales chez le Rat mâle témoin ( trait fin ), hémicastré ( trait pointillé ) et castré à la naissance ( trait fort ). Les barres représentent l'erreur-type.

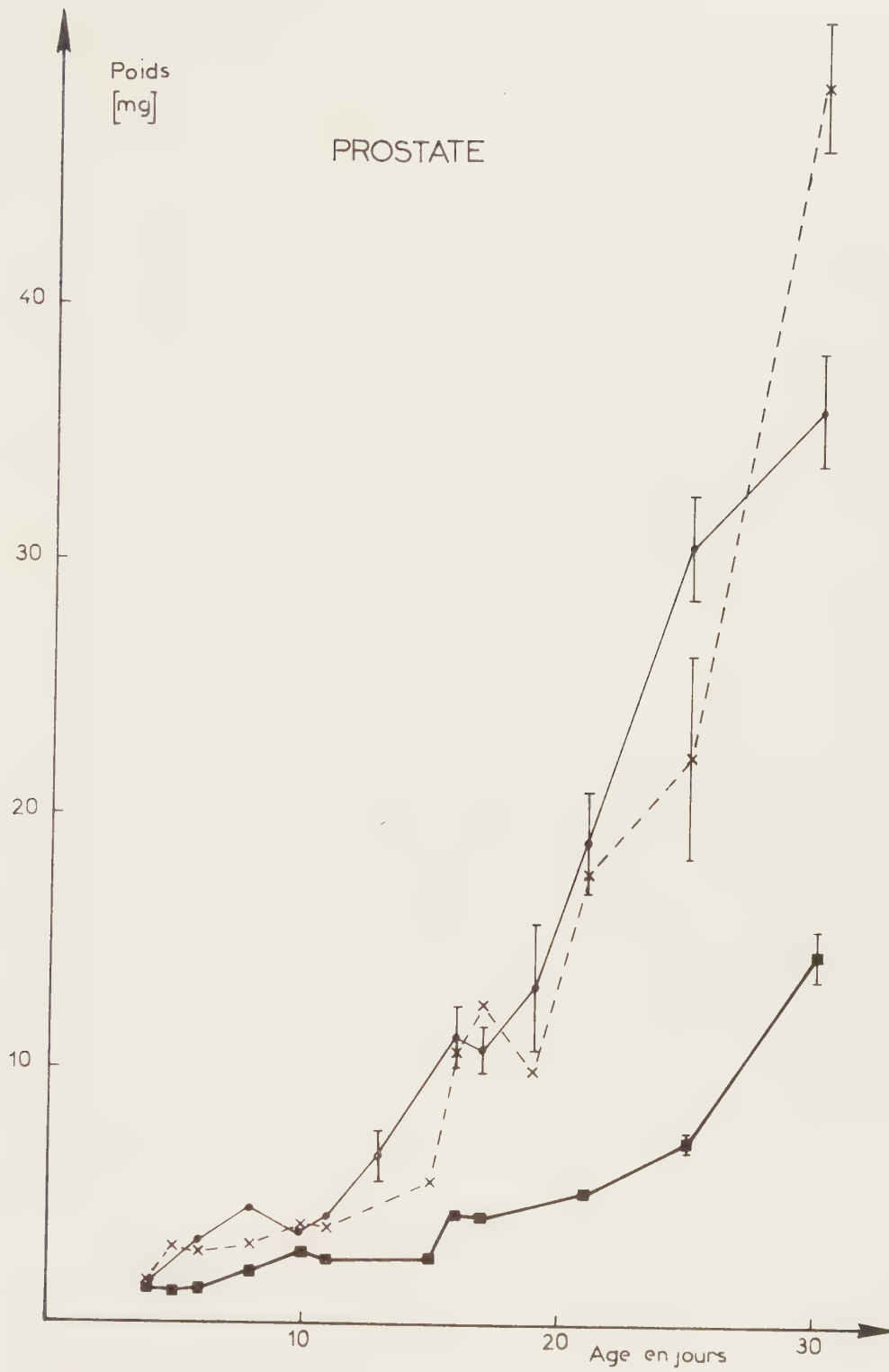


fig 5 Développement pondéral de la prostate chez le Rat mâle témoin ( trait fin ), hémicastré ( trait pointillé ) et castré à la naissance ( trait fort ). Les barres représentent l'erreur-type.

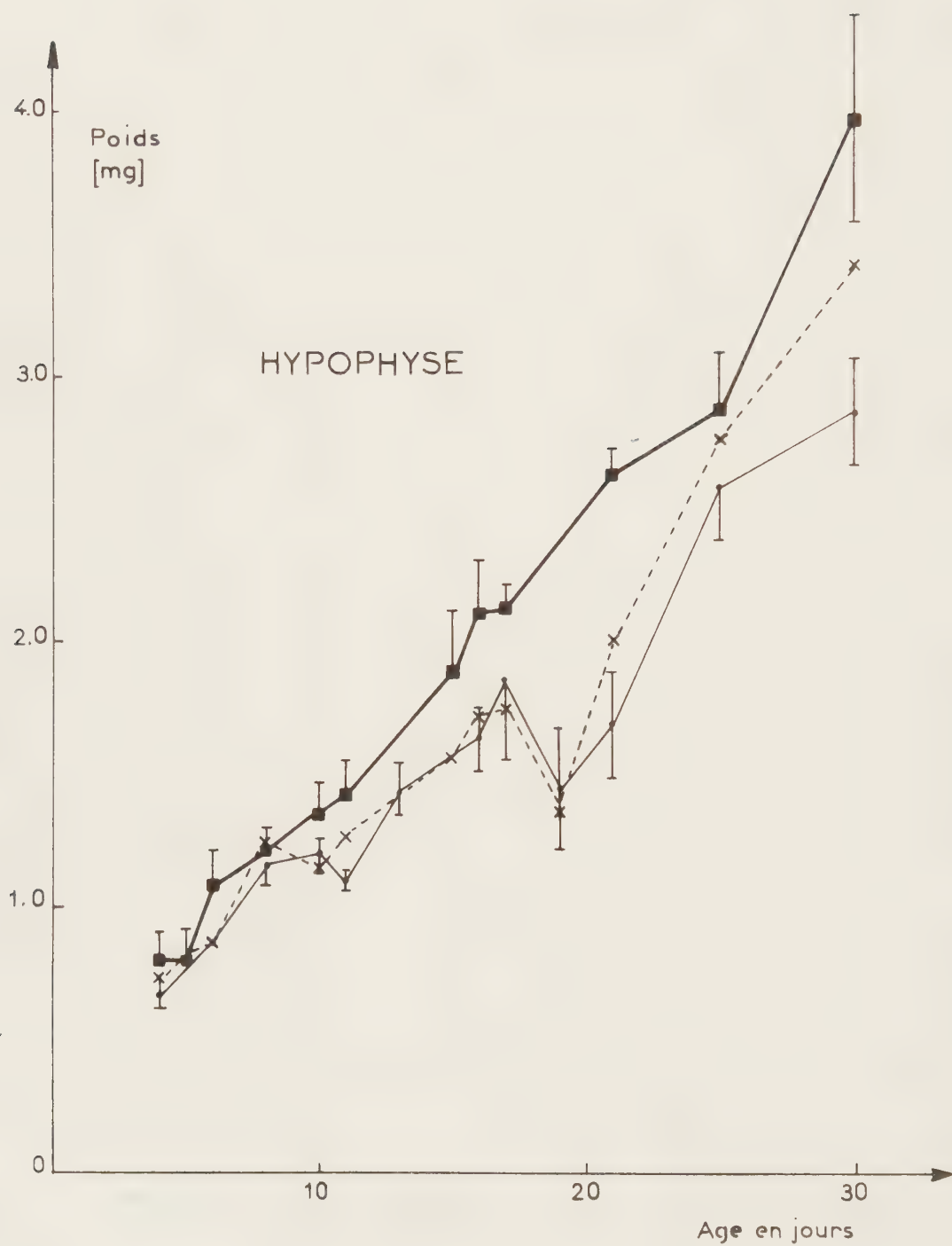


fig 6 Développement pondéral de l'hypophyse chez le Rat mâle témoin ( trait fin ), hémicastré ( trait pointillé ) et castré à la naissance ( trait fort ). Les barres représentent l'erreur-type.

### C h a p i t r e   I I I

#### L ' E P I P H Y S E   A U   C O U R S   D U   D E V E L O P P E M E N T .

##### Introduction

Chez les Rongeurs, des progrès décisifs dans l'étude de l'épiphyse ont été accomplis au cours de la dernière décennie, d'une part sur le plan anatomique et structural, en particulier grâce aux travaux de ARIENS KAPPERS ( 1960 ), et d'autre part au point de vue histochimique, avec la mise en évidence d'importantes quantités de monoamines dans la glande pinéale. L'ensemble des connaissances acquises sur l'épiphyse a été passé en revue d'une manière détaillée par KITAY et ALTSCHULE ( 1954 ) puis, plus récemment, par MOREAU ( 1964 ), JOUAN ( 1968 ), WIENER ( 1968 ), REITER ( 1969 ) et ARIENS KAPPERS ( 1969 ). Aussi nous bornerons - nous à rappeler ici quelques points importants en rapport avec notre travail.

##### Données morphologiques :

BARGMAN, dès 1943, émettait l'hypothèse, basée sur des observations en microscopie optique, du caractère neuroglandulaire de l'organe pinéal. Cette hypothèse a été vérifiée depuis par les travaux de microscopie électronique ( voir références dans KAPPERS 1969 ). Du point de vue de l'innervation, l'épiphyse du Mammifère dépend exclusivement du système sympathique postganglionnaire; elle n'est par conséquent reliée au cerveau par aucune fibre afférente ou efférente ( KAPPERS 1961 ).

#### Données biochimiques :

Parmi les substances synthétisées dans l'épiphyse, les amines biogènes, et plus particulièrement les indolamines, ont fait l'objet de nombreuses études ayant pour but de mettre en évidence leur action neurohormonale. Les monoamines les plus caractéristiques de l'épiphyse proviennent du métabolisme du tryptophane sans ouverture du noyau indolique ( fig 7 ). La présence de 5 - hydroxytryptamine, ou sérotonine, dans l'épiphyse a été démontrée par GIARMAN et DAY ( 1958 ) et par QUAY et HALEVY ( 1962 ); la mélatonine, qui en dérive par acétylation suivie d'une méthylation a été mise en évidence par LERNER et coll. ( 1958 ). La sérotonine est distribuée dans tout le cerveau, dans des proportions variables suivant les espèces mais son taux de concentration est toujours plus fort dans l'épiphyse. La mélatonine est synthétisée spécifiquement dans l'épiphyse, grâce à la présence de l'enzyme hydroxyindole - O - méthyltransférase ( AXELROD et WEISSBACH 1960 ).

#### Données physiologiques :

En ce qui concerne le rôle de la fonction épiphysaire au niveau de la sphère génitale chez le mâle, les résultats rapportés dans la littérature sont très contradictoires. Cependant, selon le récent travail de ELLIS ( 1969 ), la production *in vitro* d'androgènes par le testicule est inhibée de façon hautement significative sous l'action de la mélatonine et de la sérotonine.

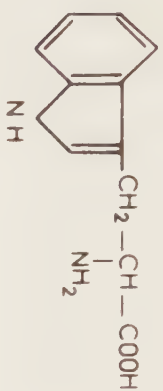
L'influence qu'exerce la glande pinéale sur la fonction gonadotrope du complexe hypothalamo - hypophysaire paraît mieux établie. A la suite des premières expériences d'implantations épiphysaire de JOHNSON et LAHR ( 1932 ), puis CLAVET ( 1933 ) et MONNIER ( 1941 ), l'hypothèse est émise d'un antagonisme épiphysio - hypophysaire contrôlant la fonction gonadotrope chez le Rat mâle. Chez la Ratte, les résultats de MOSZKOWSKA, dès 1958, ont confirmé cette hypothèse. Par la suite, l'étude de l'excrétion gonadotrope dans l'antéhypophyse du Rat mâle en incubation a permis à MOSZKOWSKA ( 1961, 1963 et 1965 ) de préciser la notion d'un antagonisme portant avant tout sur les mécanismes de l'excrétion de FSH. Enfin, selon MESS et coll. ( 1966 ), FRASCHINI et coll. ( 1968 ) et CLEMENTI et coll. ( 1968 ), l'implantation *in vivo* de mélatonine ou d'épiphyse mâle adulte, dans l'éminence médiane ou la formation réticulée, est capable d'enrayer la réponse hypophysaire à la castration chez le mâle : maintien du contenu hypophysaire normal en LH et FSH; absence de cellules de castration.

Les résultats obtenus sous l'action d'extraits épiphysaires aqueux ou acéto - niques injectés *in vivo* ENGEL ( 1935 ), FISCHER ( 1938 ), MOSZKOWSKA ( 1951 ) ou incubés *in vitro* en présence d'hypophyse de Rat mâle adulte MOSZ - KOWSKA ( 1963 ) confirment l'action freinatrice épiphysaire sur la fonction gonadotrope. Des extraits épiphysaires purifiés ont été isolés par fractionnement ( REISS et coll. 1963 a et b, SOFFER et coll. 1965 ); EBELS et coll. ( 1965 ) ont ainsi mis en évidence par filtration sur gel Séphadex la présence de deux fractions peptidiques de faible poids moléculaire, l'une inhibitrice de l'ex - crétion gonadotrope (  $F_3$  ), l'autre stimulatrice (  $F_2$  ). Enfin THIEBLOT et coll. ( 1967 ) ont également purifié un principe antigonadotrope par chromato - graphie et électrophorèse.

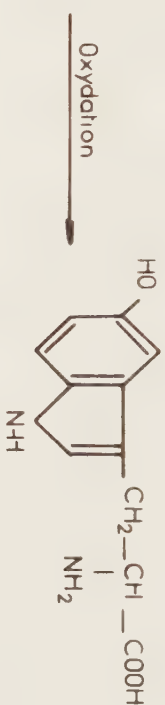
La castration ne semble pas avoir d'effet sur la glande pinéale comme l'ont observé QUAY et LEVINE ( 1957 ) et BREWER et QUAY ( 1958 ) chez le Rat adulte.

L'hypophysectomie semble avoir des répercussions différentes selon les es - pèces sur la fonction épiphysaire : augmentation de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  ( REISS et coll. 1963 ) chez le Rat, diminution importante du volume épiphy - saire chez la Souris ( ITO et MATSUSHIMA 1968 ).

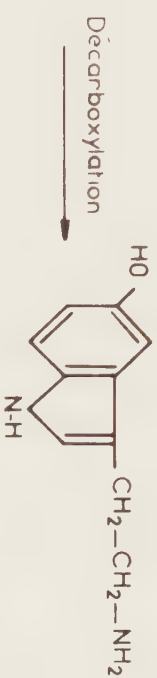
L'épiphyséctomie pratiquée chez le Rat mâle adulte ou prépubère provoque selon THIEBLOT et LE BARS ( 1955 ), THIEBLOT et BLAISE ( 1963 ), ROTH ( 1965 ) une hyperactivité testiculaire ( accroissement pondéral des glan - des annexes ); selon MOREAU ( 1964 ), elle provoque une augmentation du ma - tériel neurosécrétoire dans les noyaux hypothalamiques paraventriculaires. Au niveau hypophysaire, les résultats rapportés par les auteurs sont contradictoires ou peu significatifs ( voir revue dans MOREAU 1964, puis CLEMENTI et coll. 1966 ). Au niveau de la gonade, il importe de signaler également certaines contra - dictions parmi les résultats obtenus après épiphyséctomie, en particulier chez la femelle ( WRAGG 1967 ). Cependant, il semble que, pratiquée chez l'impubère, dans des conditions expérimentales particulières ( animaux mis en état d'hypo - fonctionnement hypophysaire par un traitement postnatal à la testostérone, puis aveuglés ou maintenus à l'obscurité permanente ), l'épiphyséctomie empêche l'inhibition du développement testiculaire due au traitement ( REITER et coll. 1968, MOSZKOWSKA et SCEMAMA 1968 ). REITER signale que cet effet n'est plus décelable 5 mois après le début de l'expérience; passé ce délai, les gonades reprennent une activité normale en présence ou en absence d'épiphysé.



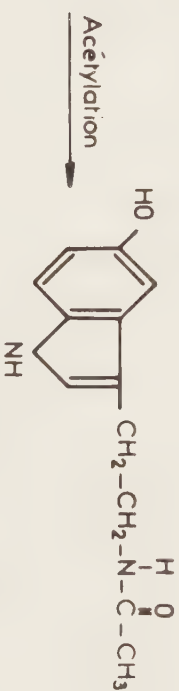
TRYPTOPHANE



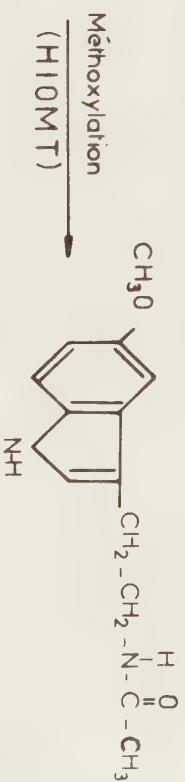
5 - HYDROXYTRYPTOPHANE



5-HYDROXYTRYPTAMINE  
(SEROTONINE)



N - ACETYL SEROTONINE



MELATONINE

fig 7

Schéma illustrant la synthèse de la sérotonine et de la mélatonine à partir du tryptophane.

D'autre part, à notre connaissance, aucun traitement de substitution par des extraits épiphysaires injectés n'a pu contrecarrer de façon significative les effets de l'épiphyséctomie chez le mâle.

Ces résultats semblent aller de pair avec la notion du rôle avant tout modulateur de l'épiphyse pouvant intervenir temporairement dans certaines circonstances au niveau des mécanismes contrôlant la fonction gonadotrope. Comme le fait remarquer KAPPERS ( 1969 ), les effets obtenus après un changement d'activité épiphysaire, ou après épiphyséctomie, tendent à disparaître au fur et à mesure qu'un " nouvel équilibre des régulations internes " s'établit.

Notre travail portant uniquement sur le rôle de l'épiphyse chez l'animal en cours de développement, nous terminerons cette introduction par quelques données sur l'évolution de la glande pinéale ante et post partum.

#### Ontogénèse :

La formation première de l'ébauche épiphysaire apparaît, chez l'embryon de Rat, vers le 14e jour ( KAPPERS 1960, OWMAN 1961 ), chez la Souris au 11e jour ( LOMBARD et GROBSTEIN 1969 ). La différenciation des pinéalcytes caractérisée par l'apparition de signes d'activité sécrétoire dans ces cellules s'effectue à la fin du 16e jour chez le Rat. Cette époque coïncide avec celle du développement du réseau vasculaire entourant l'épiphyse ( OWMAN 1961 ). Chez la Souris, la différenciation épiphysaire paraît s'amorcer entre le 13e et le 14e jour ante partum, si l'on en croit la diminution caractéristique du pouvoir inducteur de l'épithélium pinéal ( LOMBARD et GROBSTEIN 1969 ).

Les effets de l'épiphyséctomie " in utero " du fœtus de 15 - 17 jour post coitum chez le Rat ont été étudiés par OWMAN ( 1964 a ). Au niveau de la sphère génitale aucun changement provoqué par l'ablation épiphysaire n'a pu être constaté. Le seul effet observé se situe dans la partie distale de l'intestin grêle, en rapport avec l'absorption de protéines.

Nous avons déjà mentionné dans l'introduction générale, un certain nombre des travaux portant sur le développement postnatal de l'épiphyse chez le Rat et la Souris. Dans l'ensemble, les résultats rapportés parlent en faveur

1°) D'une croissance rapide et précoce de l'épiphyse pendant la période " périnatale ", suivie d'un ralentissement marqué du développement ( illustré par des mesures pondérales et volumétriques et par la chute de l'index mitotique dès la fin de la première semaine ).

2°) D'une croissance plus lente se poursuivant au-delà de la puberté.

3°) De la présence de sérotonine à la fin de la première semaine dans l'épiphyse. La localisation intracellulaire de la sérotonine dans l'épiphyse a été étudiée par BERTLER et coll. ( 1963 ) à l'aide de la méthode très élégante de fluorescence spécifique décrite par FALK ( 1962 ) puis FALK et OWMAN ( 1965 ). Ces auteurs ont constaté que 50 % de la sérotonine est stockée dans les cellules parenchymateuses de la glande et 50 % dans les terminaisons nerveuses. OWMAN ( 1964 a ) a ainsi constaté qu'à la naissance, alors que l'épiphyse ne contient aucune trace visible de sérotonine, une fluorescence verte, indiquant la présence de noradrénaline, est déjà émise au niveau des terminaisons nerveuses entourant la glande.

4°) De l'augmentation très importante du contenu en sérotonine au cours de la deuxième semaine, l'épiphyse a pratiquement atteint à cet âge son taux adulte définitif ( QUAY et HALEVY 1962 ).

5°) De la présence de variations circadiennes de ce contenu en sérotonine dès le 6e jour post partum. Ce rythme nycthéméral, chez l'adulte ( QUAY 1963 a ) comme chez le nouveau-né ( ZWEIG et coll. 1966 ), présente un maximum à 13 h; chez le jeune animal, il répond partiellement à une stimulation extrarétinienne. Le contenu de l'épiphyse en mélatonine subit d'ailleurs aussi des variations nycthémérales et l'enzyme spécifique responsable de sa formation a une activité cyclique selon un rythme circadien à contre-phase du taux de sérotonine ( QUAY 1964, AXELROD et coll. 1965 ).

Enfin, les résultats rapportés après épiphysectomie à la naissance sont contradictoires : pas ou peu d'effets sur la croissance du testicule et des glandes annexes ( ANDERSEN et WOLF 1934, KINCL et BENAGIANO 1967 ), activation du développement génital ( IZAWA 1926 ).

Nous avons effectué chez le Rat mâle une étude systématique du développement pondéral de la glande pinéale dès les premiers jours de la vie post partum, afin de préciser certains points concernant l'évolution de l'épiphyse parallèlement à celle des autres glandes endocrines ( voir chapitre II ). Nous avons ensuite, en fonction de nos résultats concernant la croissance pondérale, effectué en collaboration avec R. HÅKANSON et C. OWMAN, une étude histochimique et enzymologique de l'épiphyse, afin d'évaluer les signes d'activité au niveau cellulaire. Enfin, étant donné les résultats contradictoires rapportés à ce sujet, nous

avons repris l'épiphyséctomie ( associée ou non à la castration ) à la naissance chez le Rat et la Souris mâle, afin d'en étudier les répercussions au cours de la croissance du système endocrinien.

### Matériel et méthode

L'étude pondérale a été effectuée sur le matériel précédemment décrit ( voir chapitre II ). Les pesées ont été faites toutes les 24 h selon la même méthode et dans les mêmes conditions.

L'étude histochimique a été effectuée toutes les 24 h de la naissance au 10<sup>e</sup> jour, toutes les 48 h jusqu'au 25<sup>e</sup> jour puis tous les 5 jours entre le premier et le deuxième mois. La présence de 5 - hydroxytryptamine ( 5 - HT ) a été mise en évidence par fluorescence, selon la technique de FALK et coll. ( 1962 ), revue en détail par FALK et OWMAN ( 1965 ). La méthode est basée sur le fait que certaines catécholamines et tryptamines peuvent se condenser et former des dérivés fortement fluorescents après traitement à la formaldéhyde à 80 ° pendant 1 h . Dans le cas de tissus lyophilisés à basse température, la réaction peut être obtenue sans diffusion ni extraction des monoamines à partir de leur lieu de synthèse. La méthode permet de séparer distinctement certaines monoamines : les catécholamines provoquent une émission de lumière verte, alors qu'une fluorescence jaune est caractéristique de la 5 - HT.

Les méthodes qui ont permis l'étude enzymologique ont fait l'objet d'une description détaillée ( HÅKANSON et coll. 1967 ), nous nous contenterons de rappeler brièvement que les 3 activités enzymatiques suivantes ont été recherchées au cours du développement post partum : La tryptophane hydroxylase, la DOPA ( D L - 3,4 - dihydroxyphenylalanine ) - décarboxylase et la monoamine oxydase. Les deux premières enzymes sont indispensables à la synthèse de 5 - HT, la DOPA - décarboxylase n'étant toutefois pas spécifique. La monoamine oxydase ( MAO ) active une voie importante du métabolisme de la 5 - HT.

L'épiphyséctomie, ainsi que la castration associée à l'épiphyséctomie, a été effectuée à la naissance dans les conditions opératoires décrites au chapitre précédent et dans des travaux publiés antérieurement ( DES GOUTTES 1964, LOMBARD - DES GOUTTES 1966 a et b et LOMBARD - DES GOUTTES 1967). Les animaux ont été sacrifiés aux âges de 15, 21, 30, 40, 60 et 80 jours chez la

Souris, de 12, 21, 40, 50 et 80 jours chez le Rat. En moyenne, le nombre de cas par âge est de 15 chez la Souris, de 12 chez le Rat. Les témoins ont subi, dans la moitié des cas, le traumatisme opératoire sans ablation de la glande.

L'épiphyséctomie et la castration combinées ont été pratiquées à la naissance chez le Rat dans 30 cas; 30 animaux castrés à la naissance ont servi de témoins. Les autopsies ont été effectuées aux mêmes âges que précédemment.

### Résultats

La courbe de poids épiphysaire ( fig 2 ) révèle un développement très rapide entre la naissance et le 6e jour; après une chute de poids au 7e jour, la courbe oscille le long d'une droite de faible pente qui caractérise une croissance lente. Le rapport de poids épiphyse / hypophyse ( LOMBARD - DES GOUTTES 1966 b ) fait également ressortir le pic observé dans l'évolution du poids épiphysaire à 6 jours, malgré une forte augmentation du poids hypophysaire à cet âge.

Etant donné l'importance, au niveau hypothalamo - hypophysaire, de la période postnatale située entre le 5e et le 6e jour ( HARRIS et LEVINE 1962 ), il nous a paru intéressant de préciser nos mesures autour du pic de croissance épiphysaire enregistré au 6e jour. Dans ce but, nous avons prélevé et pesé, pendant cette période critique, à intervalles de 12 h, les épiphyses de 6 séries d'animaux, les Rats de chaque série provenant de la même nichée. Ces mesures ( LOMBARD DES GOUTTES 1966 b ) confirment l'augmentation brusque et passagère du poids épiphysaire entre le 6e et le 7e jour, contrastant avec le développement pondéral régulier des autres glandes endocrines à cet âge - là. L'épiphyse à 6 ½ jours atteint un poids maximum qu'elle ne dépassera qu'à l'âge de 25 jours. Les différences de poids observées entre 6 jours et 6 ½ jours ainsi qu'entre 6 ½ et 7 jours sont significatives ( fig 2 b ).

Du point de vue histochimique, avec les techniques utilisées, aucune fluorescence n'a pu être détectée avant l'âge de 5 jours dans le parenchyme épiphysaire. Entre le 5e et le 6e jour, époque à laquelle les premières terminaisons nerveuses s'infiltrèrent dans la glande, apparaissent quelques traces de fluorescence jaune spécifique indiquant la présence de sérotonine. Dans les jours qui suivent, la fluorescence augmente pour atteindre son intensité adulte au cours de la 3e semaine.

L'analyse enzymologique révèle la présence, dès la naissance, d'importantes quantités de tryptophane hydroxylase. Cette enzyme a pratiquement atteint au 5e jour un taux adulte. Par contre, le contenu en monoamine oxydase et en DOPA - décarboxylase reste très peu élevé au cours des 2 semaines qui suivent la naissance. Dès le 15e jour, la monoamine oxydase augmente beaucoup; son niveau atteint au 35e jour un plateau qui se prolonge jusqu'à 80 jours. Le taux de DOPA - décarboxylase augmente entre le 20e et le 35e jour, puis entre le 50e et le 60e jour ( voir fig 8 ).

L'épiphyséctomie a été pratiquée à la naissance étant donné l'importance du développement pondéral et enzymatique que nous venons de signaler au cours des premiers jours de la vie post partum. Chez le Rat comme chez la Souris, les animaux soumis à l'opération simulée ont des poids corporels et glandulaires identiques à ceux des vrais témoins.

Chez la Souris :

Les organes dont la croissance semble influencée par l'épiphyséctomie sont : le thymus, les testicules et les thyroïdes.

Le poids du thymus ( fig 9 ) est généralement plus fort en l'absence d'épiphyséctomie. A l'âge de 80 jours, la différence est hautement significative ( témoins :  $39.6 \pm 3.0$  ; opérés :  $63.8 \pm 7.0$  ).

Les testicules ( fig 10 ) ont un poids plus élevé après le 30e jour chez les Souris épiphyséctomisées. La différence avec les poids témoins est systématiquement positive, elle est plus forte aux âges de 40 et 60 jours, sans être cependant statistiquement significative (  $p < 0.1$  ). L'étude histologique des tubes séminifères des Souris opérées révèle dans plusieurs cas une dégénérescence vacuolaire des spermatocytes I et II et des spermatides contrastant avec un important développement des cellules interstitielles glandulaires.

Les thyroïdes ( fig 11 ) des Souris épiphyséctomisées ont un poids régulièrement supérieur à celui des témoins. A l'âge de 30 jours, où elle est la plus forte, la différence n'est significative qu'au seuil de 10 %.

L'épiphyséctomie chez la Souris semble n'exercer aucune influence sur le poids du corps, des surrénales et de l'hypophyse ( fig 11 ) ni sur celui des glandes annexes ( fig 10 ), malgré l'apparence très active des cellules interstitielles testiculaires.



fig 8 Activités enzymatiques dans l'épiphyse du Rat mâle au cours du développement ( tryptophane hydroxylase, DOPA - décarboxylase et monoamine oxydase ) selon HÅKANSON et coll. ( 1967 ).

Chez le Rat :

L'organe qui semble le plus influencé par l'épiphyséctomie est le thymus. Comme le montre la fig 12, chez l'animal épiphyséctomisé, sa croissance paraît accélérée et sa régression plus lente. Les différences les plus grandes se manifestent à 40 et 80 jours mais elles ne sont significatives qu'au seuil de 10 %.

Les thyroïdes sont stimulées de façon significative à l'âge de 80 jours ( fig 13 ). Cependant, aux stades antérieurs, leur croissance pondérale n'est pas sensible à l'absence d'épiphyse.

En ce qui concerne les gonades, l'épiphyséctomie à la naissance n'entraîne aucune modification importante du développement pondéral. Il en est de même pour les vésicules séminales et la prostate.

Enfin, l'ablation de la glande pinéale à la naissance n'influence pas l'évolution du poids corporel ou de l'hypophyse ( fig 13 ). A l'âge de 80 jours, les surrénales des épiphyséctomisés ont un poids plus faible que chez les témoins ( fig 14 ).

Chez le castrat, l'épiphyséctomie n'affecte pas, dans l'ensemble, le développement pondéral du système endocrinien ( voir tableau I ). Par contre, l'effet sur le thymus paraît confirmé : l'épiphyséctomie freine la régression physiologique du thymus après le 50e jour. Enfin, la prostate ventrale est significativement moins développée chez les castrats épiphyséctomisés à 40 et 50 jours.

### Discussion et conclusions

Cette étude du rôle de l'épiphyse au cours du développement postnatal nous amène aux constatations suivantes :

La croissance pondérale épiphysaire se distingue, chez le Rat, de celle des autres glandes endocrines par le fait qu'elle est très rapide entre 5 et 7 jours puis pratiquement nulle jusqu'au 22e jour ( sevrage ); elle reprend ensuite lentement jusqu'à la puberté. Chez la Souris, la courbe de croissance épiphysaire a également une pente très forte au cours des jours qui suivent la naissance, puis très faible jusqu'au sevrage ( ITO et MATSUSHIMA 1968 ).

Chez ces deux espèces de Rongeurs, l'accroissement pondéral de la glande pinéale est dû davantage à l'hypertrophie des cellules parenchymateuses qu'aux divisions cellulaires; en effet, l'index mitotique pinéal diminue rapidement au

cours de la première semaine ( QUAY et LEVINE 1957 chez le Rat, DILL et WALKER 1966 chez la Souris ).

Chez le Rat, la présence de faibles quantités de sérotonine est décelable histochimiquement 24 - 48 h avant l'arrêt brusque de croissance pondérale dont nous venons de parler. Il se peut donc qu'ici encore, on assiste à une dissociation chronologique entre la croissance et la différenciation cellulaire ( cf chapitre II ).

Du point de vue enzymologique, la présence de l'activité de la tryptophane hydroxylase dans la glande pinéale indique que les conditions d'une synthèse locale de 5 - HT sont remplies dès la naissance. Malgré la forte activité de cette enzyme dès la mise bas, la 5 - HT reste indécelable histochimiquement pendant les 4 - 5 premiers jours de la vie extra - utérine, ce qui implique soit l'absence d'une enzyme activant l'étape suivante de la synthèse, soit que cette synthèse s'effectue à des taux trop faibles pour être décelables par fluorescence spécifique. Durant la période qui suit, entre le 6e et le 20e jour post partum, l'épiphyse contient une quantité relativement grande de 5 - HT, malgré une activité très réduite de la DOPA - décarboxylase, ce qui pourrait laisser supposer l'existence de plusieurs voies conduisant à la biosynthèse de la sérotonine épiphysaire. Il semble donc que l'étape limitant la synthèse de 5 - HT serait plus difficile à terminer dans l'épiphyse que dans les autres tissus stockant des monoamines; ceci est d'ailleurs suggéré par les résultats de FALK et coll. ( 1966 ) montrant que l'inhibition de la décarboxylase, aussi bien que celle de la tryptophane hydroxylase, conduit à une réduction de la sérotonine épiphysaire ( HÅKANSON et coll. 1967 ).

La période critique de développement épiphysaire se situant précisément entre le 5e et le 7e jour, il convient ici de rappeler que, chez le Rat comme chez la Souris, cette époque coïncide avec celle de la différenciation de l'axe hypothalamo - hypophysaire sous l'action des stéroïdes sexuels ( HARRIS et JACOBSON 1952, MARTINEZ et BITTNER 1956, BARRACLOUGH et GORSKI 1961 et MAQUEO et coll. 1966 ).

L'apparition de catécholamines primaires histochimiquement décelables par leur fluorescence verte dans les noyaux hypothalamiques paraventriculaire, arqué et supraoptique, précède de quelques jours cette étape critique du développement neuroendocrinien ( BJORKLUND et coll. 1968, chez la Souris et HYYPPA 1969, chez le Rat ). Il paraît encore très prématuré d'émettre l'hypothèse

d'une relation entre l'apparition de monoamines dans certains centres neurosé - créteurs ( hypothalamus, épiphyse ) et la sensibilité de ces structures régula - trices de la fonction gonadotrope aux androgènes testiculaires. Nous nous conten - terons ici de souligner la concordance étroite de ces événements au cours du développement postnatal du Rat et de la Souris.

Enfin, les résultats de l'épiphyséctomie pratiquée avant cette période mon - trent que la croissance pondérale testiculaire est peu affectée par l'absence d'épiphyse; par contre, l'étude histologique révèle une certaine précocité dans le déroulement des étapes du premier cycle spermatogénétique précédée d'un im - portant développement du tissu interstitiel fuchsinophile ( survenant 4 - 5 jours avant la période normale de reprise d'activité du tissu de Leydig située au 17e jour chez le Rat, au 14e jour chez la Souris, voir chapitre I ).

Au niveau hypophysaire, les différences pondérales entre témoins et épiphy - sectomisés sont de faible amplitude; une différence significative dans le contenu hypophysaire en hormones gonadotropes a été mesurée à 21 et 40 jours comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Une discussion approfondie des résultats obtenus après épiphyséctomie à la naissance sur le poids des thyroïdes, du thymus et des surrénales ne trouvant pas sa place dans le cadre de ce travail, nous nous contenterons de les interpréter ici très brièvement. Le fait que la courbe de poids des thyroïdes chez les épi - physéctomisés ait un tracé généralement supérieur à celui des témoins vient confirmer les travaux de MOREAU ( 1964 ) et ceux de SEEPOVIC et SCHIP - PERS ( 1965 ) qui observent une hyperactivité des cellules thyroïdiennes plusieurs mois après épiphyséctomie. Nos observations indiquent également que ce n'est qu'à 80 jours que le poids thyroïdien est significativement plus élevé chez les épiphyséctomisés.

L'ablation épiphysaire freine chez le Rat la croissance surrénalienne entre le 60e et le 80e jour, phénomène qu ' IZAWA et l'école japonaise ont aussi obser - vé. C'est à cet âge également qu'elle prévient la régression physiologique du thymus ( 15 % au lieu de 40 % chez le Rat, 30 % au lieu de 90 % chez la Souris ). Ces constatations viennent appuyer les travaux de BEARN ( 1967 ) qui, dès la fin de la vie embryonnaire a montré l'action inhibitrice de la surrénale ( et de l'axe hypophyso - surrénalien par conséquent ) sur le développement du thymus. Rappelons à ce propos que le thymus joue un rôle très important dans les jours qui suivent la naissance : croissance corporelle, incompétence immunologique ( MILLER 1962 ) et action stérilisante des stéroïdes sexuels injectés avant

le 5e jour ( KINCL et MAQUEO 1966 ). Or nos mesures pondérales révèlent qu'au moment où la croissance thymique est très importante ( 6e jour post partum ), la croissance surrénalienne est très faible.

Chez les castrats, la reprise de croissance de la prostate après 21 jours semble bloquée par l'épiphyséctomie. Cet effet pourrait résulter d'un retard de développement surrénalien comme nous l'avons observé chez les épiphyséctomisés non castrés; on sait en effet que la reprise de croissance de la prostate du castrat observée par PRICE ( 1936 ) et DES GOUTTES ( 1964 ) est en partie attribuable au taux de corticoïdes circulant. La même explication s'appliquerait au retard de l'involution thymique chez le castrat épiphyséctomisé par rapport au castrat. Une autre explication de l'effet PRICE ferait intervenir la prolactine dont le taux augmenterait davantage après castration qu'après castration et épiphyséctomie. MOSZKOWSKA ( 1965 ) interprète de cette façon la différence de réponse pondérale des vésicules séminales et de la prostate aux injections de mélatonine.

En définitive, l'épiphyséctomie pratiquée à la naissance paraît n'avoir qu'une influence très limitée sur le développement pondéral des glandes endocrines et annexes chez le mâle, ce qui est en accord avec les résultats d' ANDERSEN et WOLF ( 1934 ) et de KINCL et BENAGIANO ( 1967 ).

Nous examinerons dans le chapitre suivant la question de savoir si cette ablation a des répercussion sur le contenu hypophysaire en hormones gonadotropes au cours de la croissance.

| A G E<br>(jours) |                              | Poids du corps<br>( g ) | Hypophyse<br>( mg ) | Thyroïdes<br>( mg ) | Thymus<br>( mg ) | Prostate ventrale<br>( mg ) |
|------------------|------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|------------------|-----------------------------|
| 12               | Castrats                     | 28 ± 2                  | 1.86 ± .14          | 3.29 ± .40          | 105 ± 14         | 2.43 ± .24                  |
|                  | Castrats<br>épiphysectomisés | 23 ± 2                  | 1.72 ± .13          | 3.09 ± .13          | 85 ± 10          | 2.16 ± .20                  |
| 21               | Castrats                     | 49 ± 4                  | 3.29 ± .17          | 4.66 ± .43          | 226 ± 22         | 8.77 ± 1.51                 |
|                  | Castrats<br>épiphysectomisés | 44 ± 2                  | 3.07 ± .07          | 4.10 ± .26          | 198 ± 11         | 9.16 ± 1.50                 |
| 40               | Castrats                     | 136 ± 10                | 6.99 ± .38          | 11.70 ± .80         | 548 ± 35         | 11.45 ± .50                 |
|                  | Castrats<br>épiphysectomisés | 136 ± 6                 | 6.93 ± .10          | 9.70 ± .85          | 561 ± 53         | 7.14 ± .97                  |
| 50               | Castrats                     | 155 ± 8                 | 8.08 ± .74          | 13.00 ± 2.00        | 516 ± 74         | 11.10 ± .85                 |
|                  | Castrats<br>épiphysectomisés | 167 ± 16                | 8.05 ± .63          | 13.50 ± 1.00        | 650 ± 30         | 7.34 ± .47                  |
| 80               | Castrats                     | 243                     | 10                  | 17                  | 480              | 8.5                         |
|                  | Castrats<br>épiphysectomisés | 217                     | 10                  | 17                  | 532              | 8.8                         |

Tableau I

Les pesées et leurs erreurs - type correspondent à une moyenne de 7 - 8 animaux par catégorie.

A 80 jours les mesures ne sont données qu'à titre indicatif ( moyenne sur 3 animaux par cat. ).

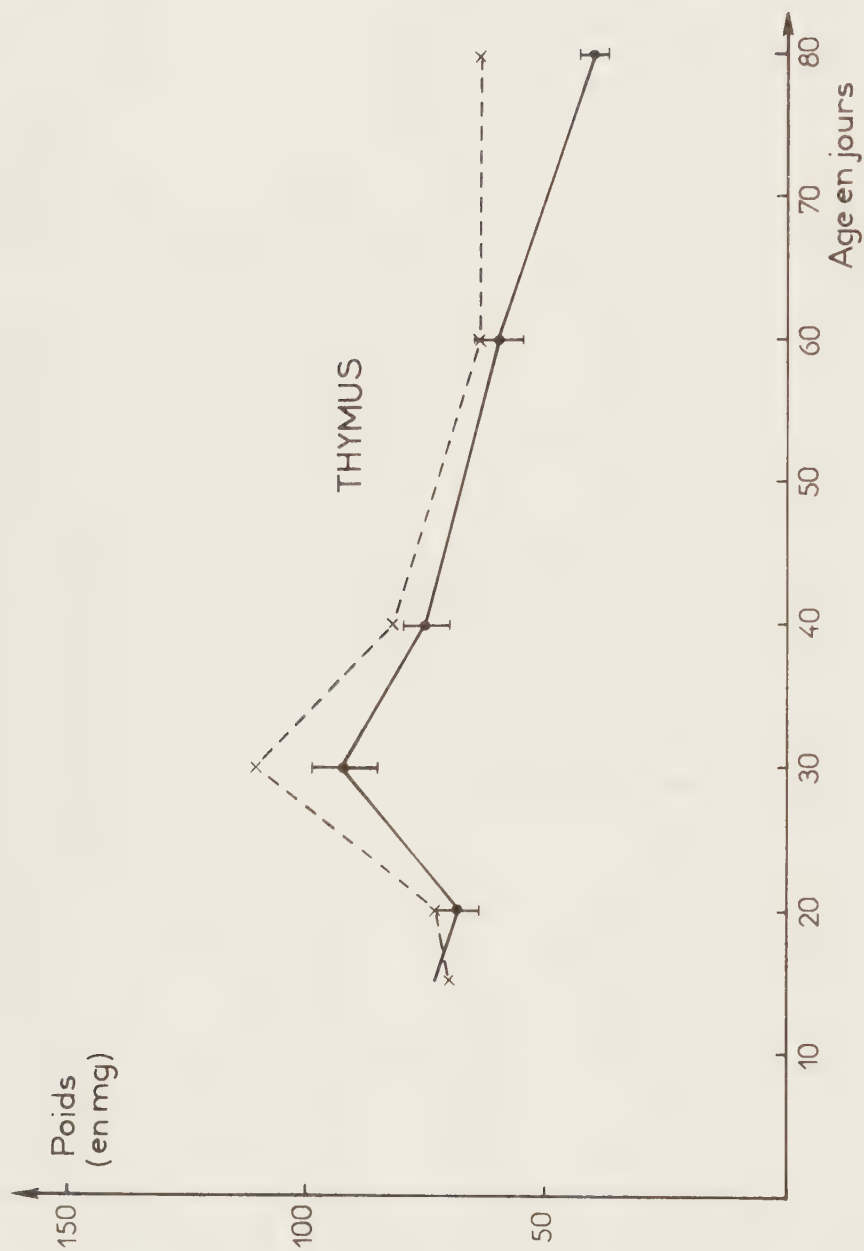


fig 9 Développement pondéral du thymus chez la Souris mâle. Le trait plein correspond aux poids des témoins, le trait pointillé aux animaux épiphysectomisés à la naissance. Les erreurs - type sont du même ordre de grandeur dans les deux groupes et n'ont été tracées que pour les témoins; la différence n'est significative qu'à 80 jours.

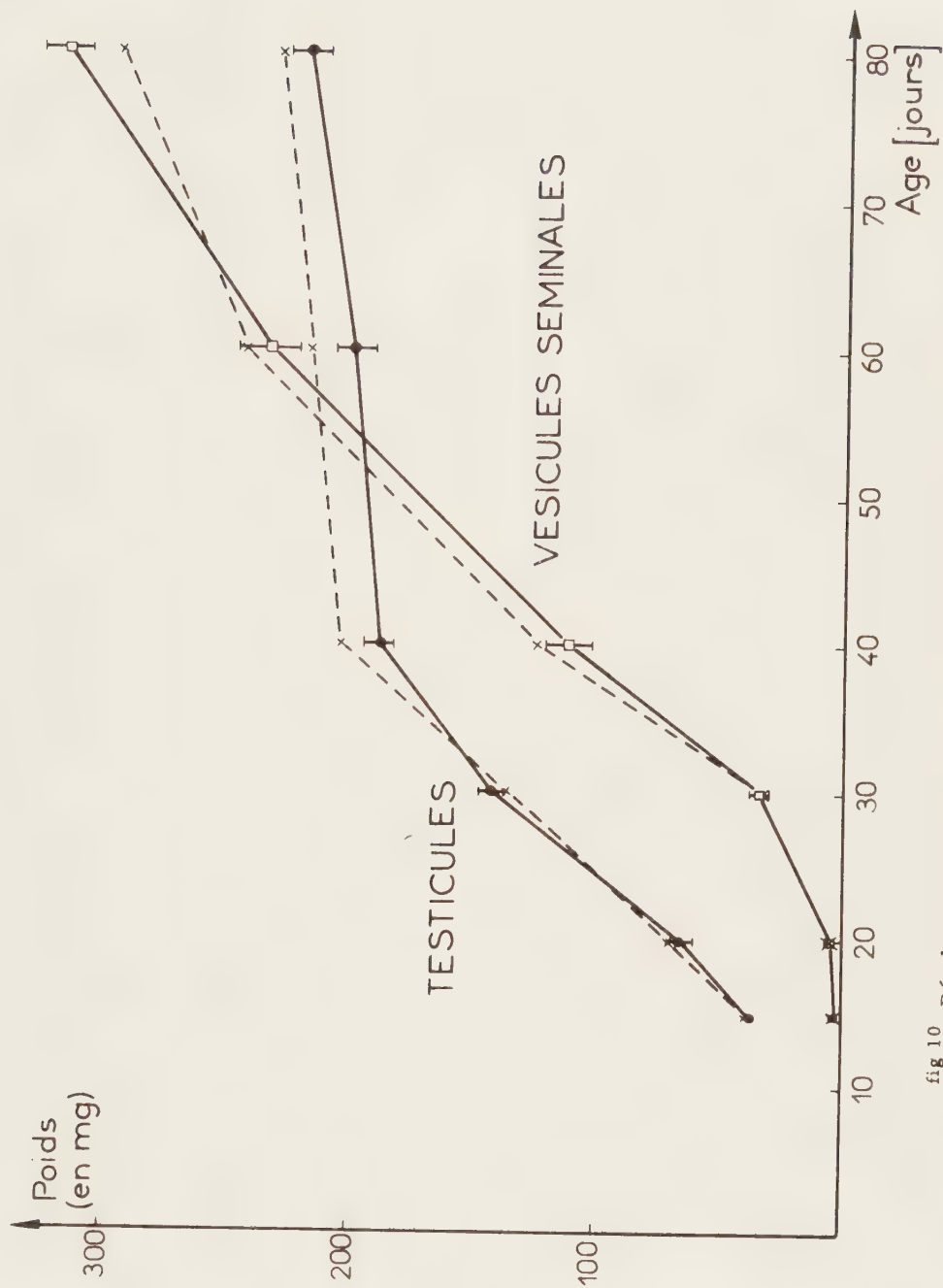


fig 10 Développement pondéral des testicules et des vésicules séminales chez le Souris mâle témoin ( trait plein ) et épiphysectomisée à la naissance ( trait pointillé ). Les erreurs - type sont du même ordre de grandeur dans les deux groupes; les différences ne sont jamais significatives.

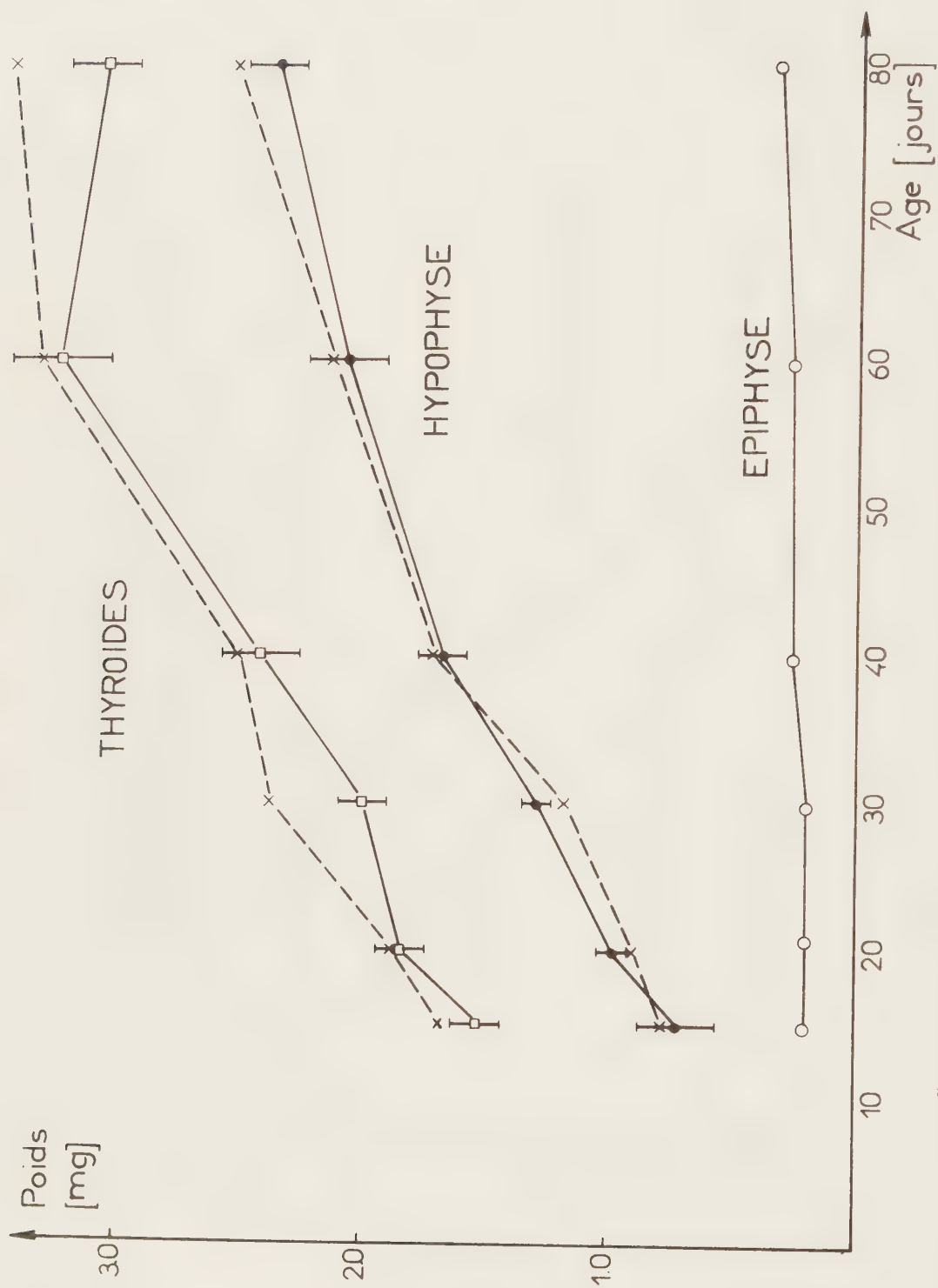


fig 11 Développement pondéral des thyroïdes et de l'hypophyse chez la Souris mâle témoin ( trait plein ) et épiphysectomisée à la naissance ( trait pointillé ). Les différences ne sont pas significatives. Le développement pondéral des épiphyses témoins est également représenté.

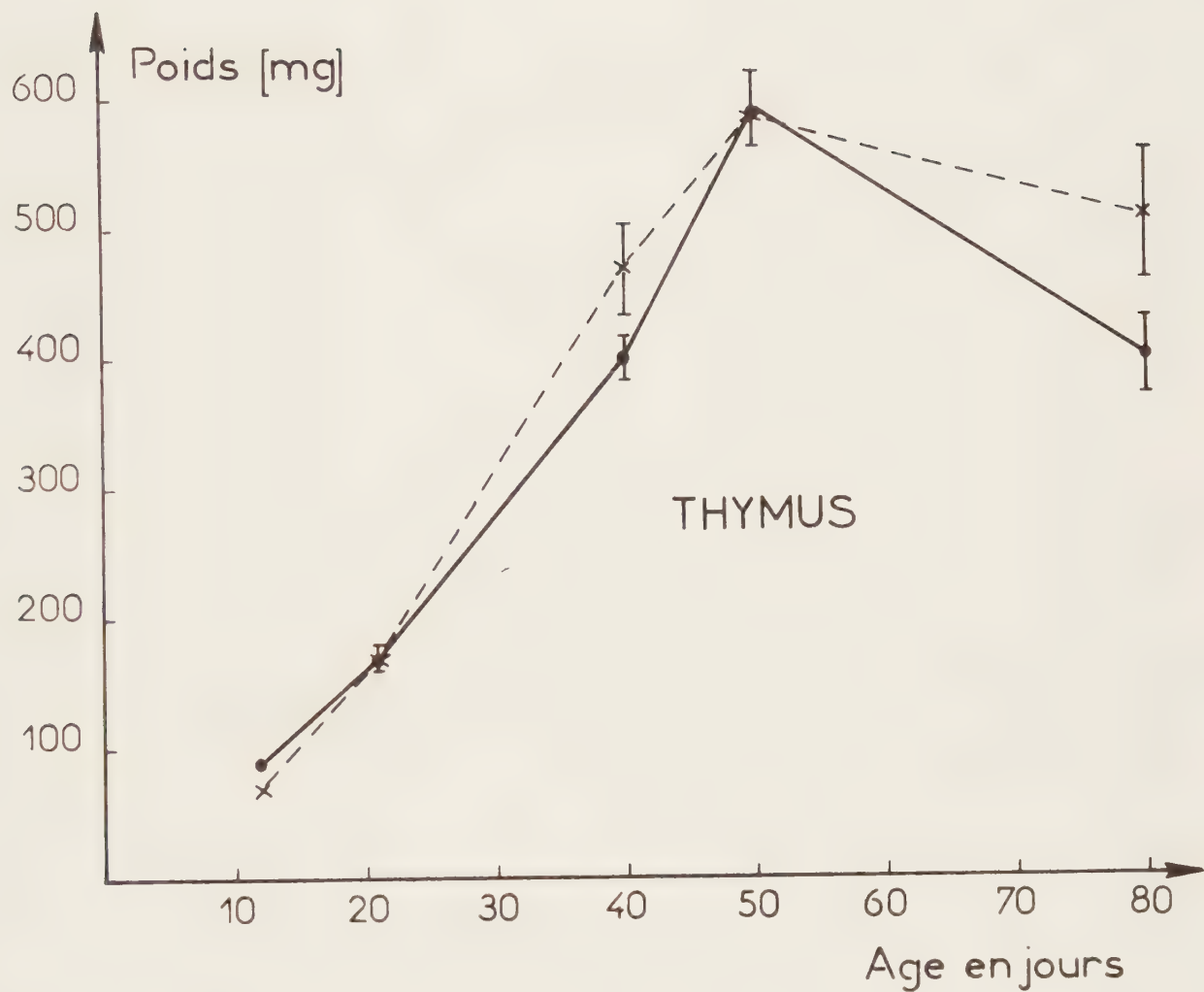


fig 12 Développement pondéral du thymus chez le Rat mâle témoin ( trait plein ) et épiphysectomisé à la naissance ( trait pointillé ). Les barres verticales représentent les erreurs - type.

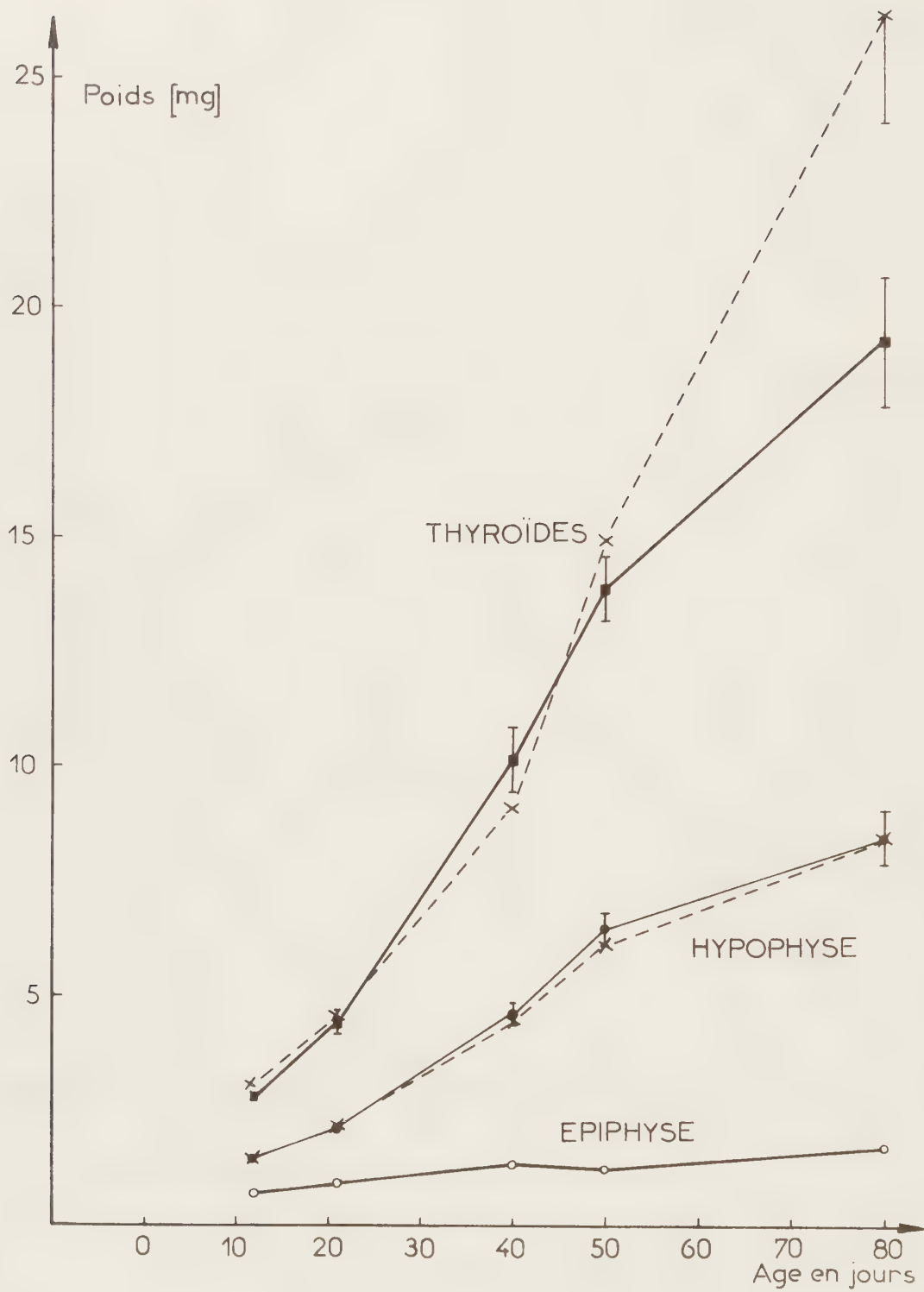


fig 13 Développement pondéral des thyroïdes et de l'hypophyse chez le Rat mâle témoin (trait plein) et épiphysectomisé à la naissance (trait pointillé). Les barres verticales représentent les erreurs - type. Le développement pondéral des épiphyses témoins est également représenté.

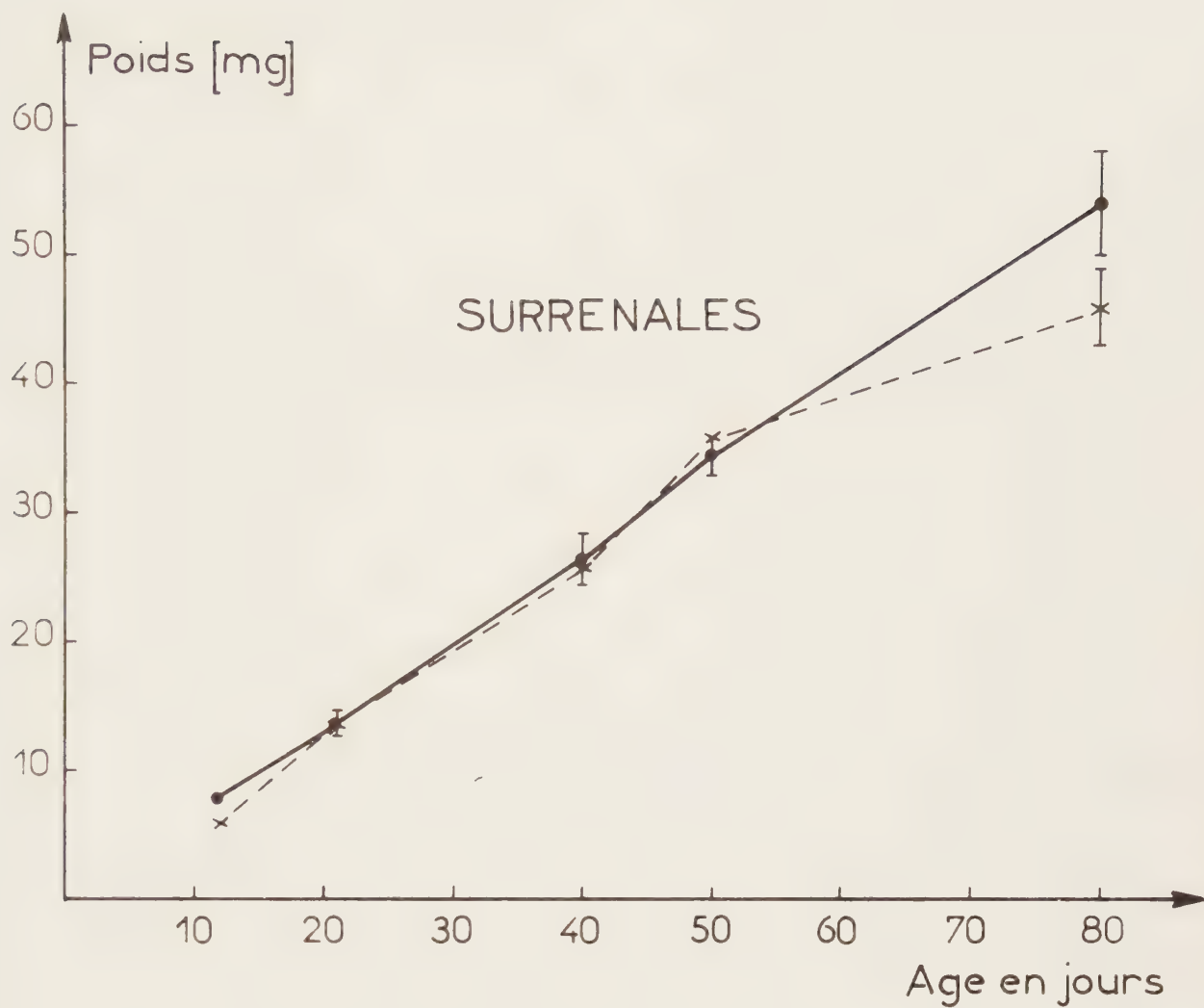


fig 14 Développement pondéral des surrénales chez le Rat mâle témoin ( trait plein ) et épiphysectomisé à la naissance ( trait pointillé ). Les barres verticales représentent les erreurs - type.



## C h a p i t r e   I V

### ETUDE   DU   CONTENU   HYPOPHYSAIRE   EN   HORMONES

### GONADOTROPES .

#### Introduction

En l'absence de méthode chimique ou physique, une grande variété de tests biologiques permettent de doser les hormones gonadotropes. L'ensemble de la question a souvent fait l'objet d'exposés généraux. L'article de revue de HAMBURGER ( 1957 ) et celui de PELLETIER ( 1967 ), entre autres, résument très clairement la situation. D'une façon générale, les principales difficultés auxquelles se heurte tout dosage biologique sont de deux ordres. Les premières sont essentiellement liées aux questions de sensibilité ( seuil de réponse plus ou moins élevé ), de spécificité et de reproductibilité ( variations de la sensibilité et de la spécificité d'une souche d'animaux - test à l'autre, voire à l'intérieur d'une même souche, variations qui peuvent avoir une origine génétique ). Le second type de difficultés est inhérent aux substances mal définies chimiquement : les résultats sont souvent affectés par la méthode d'extraction.

Toutes ces causes d'incertitudes se reflètent évidemment dans la précision du dosage et rendent extrêmement incertaine, sinon impossible, l'estimation absolue d'un taux hormonal.

En ce qui concerne les extraits hypophysaires bruts, la question est peut - être encore plus délicate en ce sens que la substance dosée représente une somme d'hormones et que la mesure correspond à un effet global. Les différentes composantes sont donc difficiles à séparer ( c'est presque toujours le cas de FSH et LH ) et l'interprétation des résultats est malaisée.

Les dosages radioimmunologiques ( voir revue dans HAYASHIDA 1966 et MIDGLEY 1967 ) ont récemment permis de grands progrès grâce à l'application de techniques hautement sensibles et spécifiques. La mise au point de ces procédés implique cependant un équipement très important et très spécialisé.

La méthode de dosage que nous avons utilisée est basée sur l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les testicules du Poussin nouveau - né proportionnellement au taux d'hormones gonadotropes injectées. La sensibilité du testicule d'Oiseau aux gonadotropines est connue depuis longtemps et de nombreux tests utilisant l'augmentation du poids des gonades en fonction de la dose d'hormones gonadotropes administrées ont été proposés. MONEY et RAWSON ( 1955 ) ont montré que des extraits hypophysaires bruts étaient capables de stimuler l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans le testicule ainsi que dans la thyroïde du Poussin nouveau - né. L'incorporation dans la thyroïde leur a permis de mettre au point un test relativement sensible pour l'hormone TSH.

Dans le cas du testicule, les travaux décisifs ont été effectués par FLOR - SHEIM et coll. ( 1959 ). Ceux - ci ont montré qu'excepté la prolactine, les gonadotropines, à faible dose, stimulent l'incorporation de  $^{32}\text{P}$ . Les autres hormones hypophysaires n'ont pas d'action ou agissent à des doses nettement ( 1000 X ) plus fortes. Ils ont observé, de plus, que la testostérone ou d'autres stéroïdes comme les oestrogènes sont sans effet.

L'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les testicules du Poussin nouveau - né a donc été utilisée avec succès comme méthode de dosage ( BRENNEMAN et coll. 1962, FOLLET et FARNER 1966, GOGAN 1969 ). Sa faible spécificité à l'égard des hormones FSH et LH limite son champ d'application. Par contre, elle présente l'avantage d'être relativement rapide et précise ( indice de précision  $\lambda = 0.2 - 0.3$  ) et de ne nécessiter que de petites quantités de matériel. A ce propos, il est important de signaler que, par comparaison, les doses de FSH nécessaires pour accroître de façon significative le poids ovarien de Rattes impubères pré - traitées à HCG ( STEELMAN et POHLEY 1953 ) sont 25 - 50 fois plus fortes. Ce dernier avantage est déterminant dans le cas d'hypophyses d'animaux très jeunes.

Nous avons effectué l'étude de l'apparition et de l'évolution du contenu hypophysaire en gonadotropines au cours du développement ante- et post partum chez la Souris mâle. D'autre part, chez le Rat mâle, l'évolution de l'activité gonadotrope hypophysaire a été étudiée au cours du développement post partum, ainsi que l'influence, sur cette évolution, de l'épiphysectomie, de la castration et des deux opérations associées, pratiquées à la naissance.

### Matériel et méthode

Nous avons dosé le contenu en hormones gonadotropes des hypophyses prélevées, à l'aide du test de FLORSHEIM et coll. légèrement modifié. Le dosage consiste à comparer l'activité d'une préparation de broyats hypophysaires à celle d'hormones purifiées. Dans le cas des animaux opérés, l'activité des hypophyses est également comparée à celle des broyats hypophysaires témoins.

Les hypophyses prélevées sont broyées par ensemble de 5 - 20 environ suivant l'âge, ce nombre pouvant atteindre 100 - 150 dans le cas des stades embryonnaires. Le broyat est dilué dans du liquide physiologique de Ringer à la concentration voulue et de façon à obtenir dans chaque cas deux solutions situées dans un rapport 1 - 2 de concentration. Les diverses manipulations et la conservation des dilutions s'effectuent à basse température ( 0 - 4 ° C ).

Les doses standard établies à partir d'extraits hypophysaires purifiés ( CNRS M1 et M2 ) LH et FSH ovines sont préparées de la même façon : dilution dans du liquide physiologique de Ringer de manière à avoir pour chaque hormone deux solutions dans un rapport 1 - 2 de concentration.

Les solutions hormonales sont injectées aux Poussins mâles de 24 h, à raison de 0.2 ml par animal. Chaque catégorie ( dose ) est représentée par un groupe de 8 Poussins. Les témoins reçoivent 0.2 ml de liquide physiologique. Après 6 h, on injecte à chaque animal 0.2 ml d'une solution contenant 1.2 - 1.5  $\mu$  Curies de  $^{32}\text{P}$ .

Les Poussins sont sacrifiés 18 h plus tard par décapitation. Leurs gonades sont prélevées et pesées immédiatement à la balance Mettler ( précision 0.05 mg ). Elles sont ensuite séchées et leur activité en  $^{32}\text{P}$  est mesurée à l'aide d'un compteur Geiger couplé avec un passeur automatique d'échantillons ( Nuclear Chicago ). L'activité est exprimée en nombre d'impulsions enregistrées par unité de temps et par mg de testicule. Le  $^{32}\text{P}$  ayant une période de 14.3 jours,

il n'est pas nécessaire de tenir compte de la baisse de la radioactivité pendant la durée du comptage.

La loi de FECHNER - WEBER ( 1834 ), que l'on postule dans tout dosage basé sur une proportionnalité entre stimulation et réponse, stipule que la relation entre l'effet et le logarithme de la dose est linéaire. La validité de cette hypothèse ne s'étendant qu'à un intervalle restreint de doses, la mise au point du test consiste à déterminer le domaine de linéarité des hormones de référence. La comparaison entre activité d'une substance standard et activité d'une substance " inconnue " n'est possible que dans la mesure où les deux droites de réponses " standard " et " inconnue " sont parallèles. Cette condition est nécessaire en ce sens que le parallélisme est garant d'une équivalence des effets biologiques; elle n'est pas suffisante, le parallélisme pouvant être fortuit, dû à la combinaison de plusieurs effets.

Pour chaque gonadotropine prise comme référence, les deux doses injectées sont choisies dans le domaine de linéarité de la réponse en fonction du logarithme de la dose. La quantité de liquide que reçoit chaque Poussin étant fixe, le test revient à chercher, pour chaque stade hypophysaire étudié, la concentration de broyat nécessaire à reproduire les réponses standard.

Les résultats font l'objet d'une analyse statistique détaillée. Elle a été effectuée à l'aide d'un code mis au point par M. VASSENT. Les données, poids des gonades et impulsions enregistrées par unité de temps, font tout d'abord l'objet d'une analyse en régression. Elles sont ensuite ajustées à un poids testiculaire moyen, puis les résultats sont soumis à l'analyse de variance d'un dosage en 4 points.

En ce qui concerne les réponses aux hormones purifiées, la fig 15 présente un cas typique d'étalonnage. Elle montre en particulier que le domaine de linéarité correspond à des doses de LH deux fois moins fortes que celles de FSH. D'autre part, la différence de pente qui pourrait théoriquement permettre de distinguer entre les deux hormones est trop faible pour qu'il soit possible de séparer les effets. Dans ces conditions, les résultats du dosage indiquent des taux globaux de gonadotropines qui peuvent être exprimés pour raison de commodité par rapport à l'un ou l'autre des standard, indifféremment. Pour obtenir une réponse donnée, la dose nécessaire de LH étant plus faible que celle de FSH, nous avons choisi d'exprimer nos résultats en  $\mu$  g équivalents de LH.

## Résultats

### A. Chez la Souris

Le contenu hypophysaire en hormones gonadotropes a été évalué en  $\mu$ g équivalents de LH aux âges de 16 - 17 jours et de 18 - 19 jours ante partum, à la naissance, puis à 5, 10, 16 et 30 jours. Les dosages de l'hypophyse mâle adulte, ainsi que de l'hypophyse de la femelle gestante, ont également été effectués.

En ce qui concerne les stades embryonnaires, l'activité gonadotrope est très faible, 10 - 100 fois moindre que dans le cas de l'hypophyse de 1 jour. Le seuil de réponse de la gonade du Poussin nouveau - né étant de l'ordre de 1  $\mu$ g de LH, le nombre d'hypophyses embryonnaires nécessaires pour obtenir un effet mesurable est d'environ 100 - 1000 par Poussin. Dans ces conditions nous avons été amenée à modifier quelque peu notre technique : les broyats d'hypophyses embryonnaires ont été dilués dans une préparation de LH purifiée. L'augmentation de la réponse par rapport aux standards permet d'estimer le taux de gonadotropines aux stades ante partum à partir de quantités raisonnables de matériel.

Un exemple caractéristique de dosage d'hypophyses embryonnaires est présenté dans la fig 16. Le non - parallélisme apparent des droites réponse n'est pas significatif. A 18 jours ante partum, les hypophyses femelles ont un contenu en gonadotropes plus grand que les mâles, la différence avec les témoins ( LH pure) est significative. En ce qui concerne les hypophyses embryonnaires mâles, l'effet est moins net. Il est évident que la méthode utilisée ne permet pas une estimation très précise du contenu en gonadotropes des hypophyses embryonnaires; elle donne néanmoins un ordre de grandeur.

L'évolution du contenu hypophysaire en gonadotropes est présenté dans la fig 17. Aux 16e jour de la vie embryonnaire, dans nos conditions expérimentales, les gonadotropines hypophysaires n'apparaissent qu'à l'état de traces, l'activité étant  $10^4$  -  $10^5$  fois plus faible que chez l'adulte. Au 18e jour, le contenu n'a augmenté significativement que chez les femelles. Un seuil important se manifeste à la naissance à partir duquel l'évolution se fait régulièrement ( croissance linéaire en échelle logarithmique ) : de 5 - 30 jours les valeurs s'alignent sur une droite. Le prolongement de cette droite aux stades embryonnaires permet d'établir une limite supérieure du contenu en gonadotropes de l'hypophyse foetale.

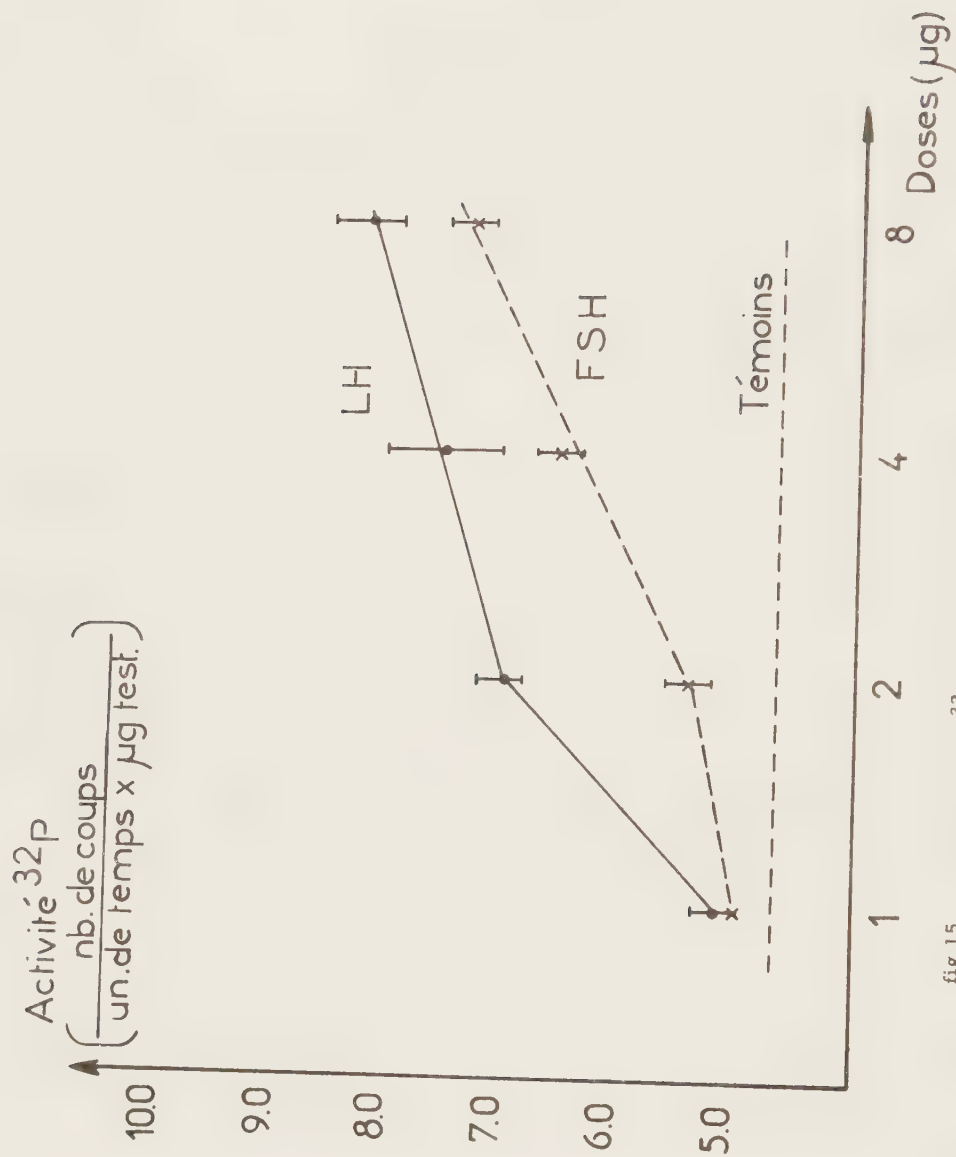


fig 15 Incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans le testicule de Poussin nouveau-né en fonction de la dose d'hormone gonadotrope injectée.

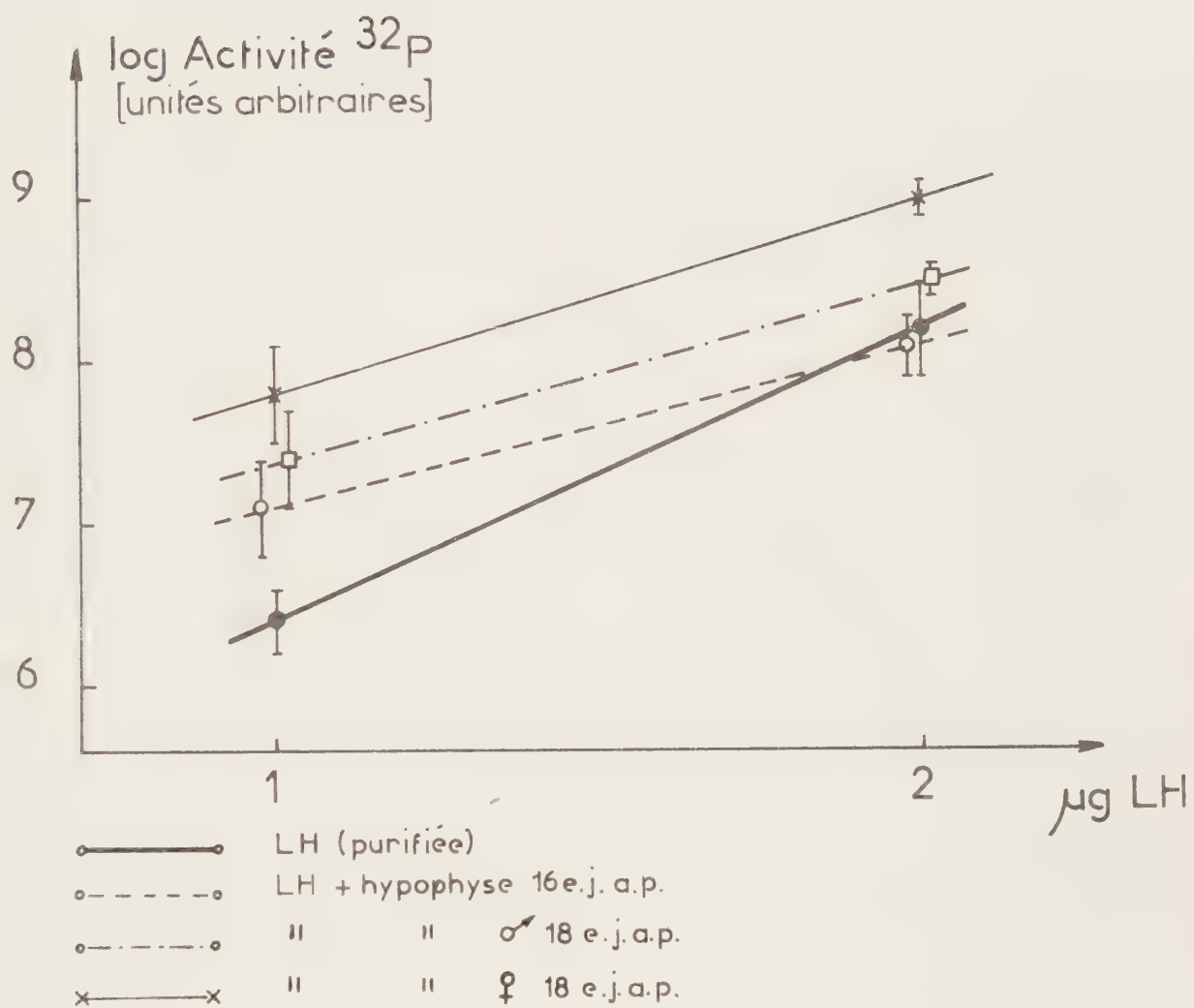


fig 16 Dosage du contenu hypophysaire embryonnaire en hormones gonadotroques  
chez la Souris.

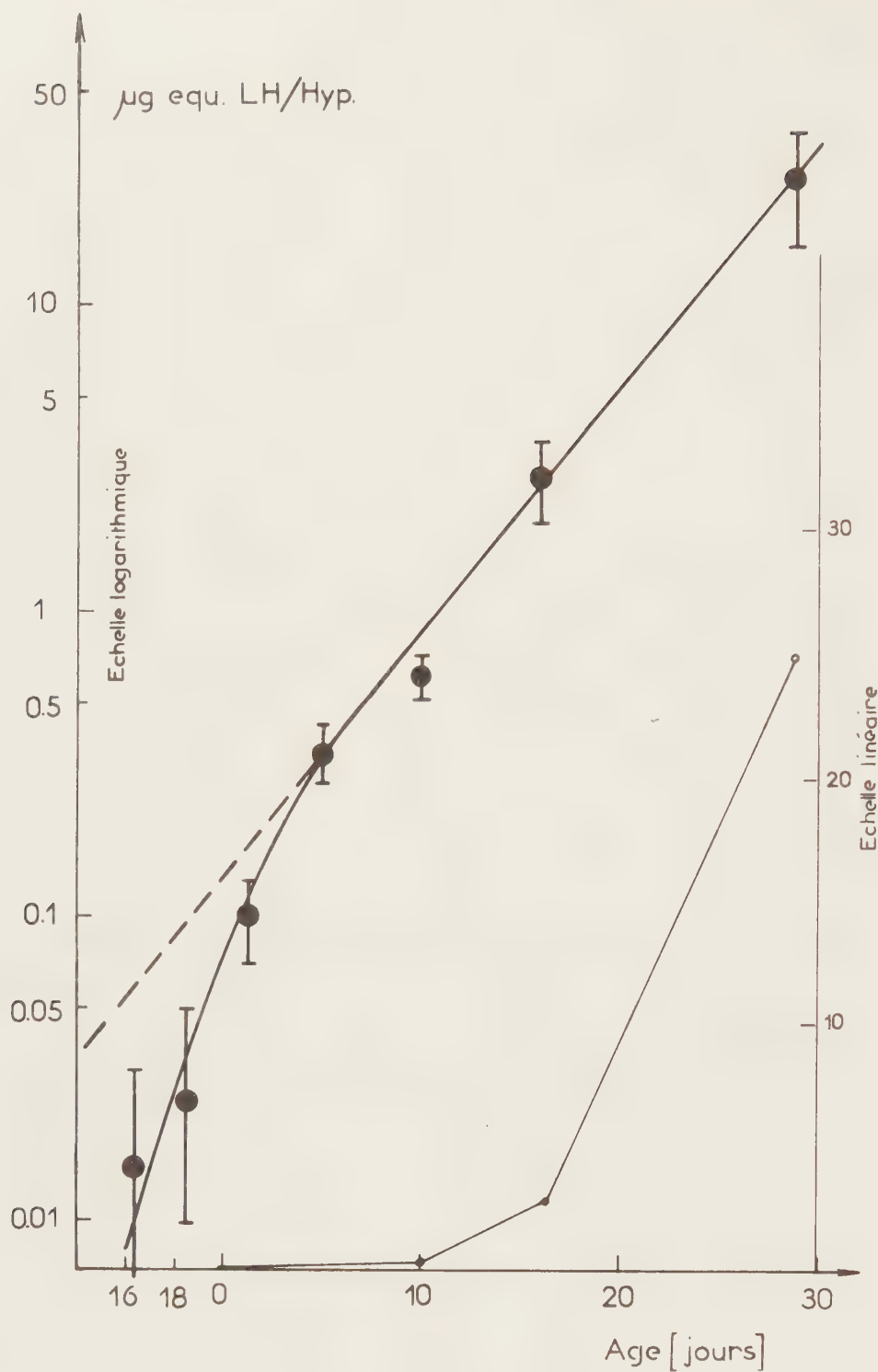


fig 17 Evolution du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes chez la Souris mâle au cours du développement ( échelle logarithmique et linéaire ). Les barres verticales correspondent à l'erreur - type.

Rappelons à ce propos qu'à la fin de la gestation les cellules A. P. S. positives se dégranulent dans le parenchyme adénohypophysaire et que cytochimiquement ( cf chapitre I ), il faut attendre le 6e jour post partum pour voir réapparaître des granules glycoprotidiques A. P. S. positifs dans les cellules gonadotropes.

Parallèlement, la croissance pondérale de l'hypophyse se développe de façon similaire mais moins rapide, ce qui fait que la concentration de gonadotropines par unité de poids augmente, elle aussi, régulièrement au cours du développement. A l'âge de 30 jours, l'activité hypophysaire atteint les 2/3 de sa valeur adulte. Le tableau II indique les doses trouvées chez le mâle adulte et chez la femelle gestante :

|                                                          | $\mu\text{g}$ équivalents de LH / hypophyse |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Hypophyse mâle adulte                                    | $22 \leq 28 \leq 36$                        |
| Hypophyse de la femelle gestante ( fin de la gestation ) | $4 \leq 7 \leq 11$                          |

Tableau II Les valeurs inférieures et supérieures correspondent aux limites de l'intervalle de confiance à 95 %.

L'hypophyse du mâle adulte contient donc 4 fois plus de gonadotropes que celle de la femelle en fin de gestation; il convient de signaler cependant que son poids est presque 2 fois supérieur.

#### B. Chez le Rat

Le contenu hypophysaire en hormones gonadotropes a été dosé à 12, 21, 40, 50 et 80 jours chez l'animal normal, épiphysectomisé, castré et castré épiphysectomisé. Les différentes opérations sont effectuées dans les deux jours qui suivent la naissance.

Chez l'animal normal l'évolution est régulière ( droite en échelle logarithmique ), jusqu'au moment où les gonadotropines hypophysaires atteignent leur taux maximum, entre 50 et 80 jours. Les résultats en  $\mu\text{g}$  équivalents de LH sont représentés dans la fig 18 . Pendant la même période, le poids hypophysaire se

développe de façon similaire. Toutefois sa croissance est plus lente, si bien que la concentration ( gonadotropines par unité de poids hypophysaire ) augmente comme c'est le cas chez la Souris.

Ces résultats sont en bon accord avec ceux de GROSSBERG et SCHWARTZ ( 1968 ) qui observent de la naissance à la puberté une évolution semblable pour le contenu hypophysaire en LH dosé par la méthode de PARLOW ( déplétion de l'acide ascorbique ovarien chez la Ratte pseudo - gestante ). Ils sont également à rapprocher des résultats obtenus par le dosage de la FSH pituitaire au cours du développement à l'aide de la méthode de STEELMAN et POHLEY ( 1953 ) modifiée par MOSZKOWSKA ( 1963 ), résultats qui sont présentés dans la fig 19. Ces constatations confirment la valeur du test de FLORSHEIM, bien qu'il représente une méthode " interspécifique " : gonadotropines mammaliennes agissant sur le testicule d' Oiseau ( GOGAN 1969 ).

L'épiphysectomie ne provoque pas de changement radical du taux de gonadotropines hypophysaires au cours du développement. Comme le montre la fig 18, l'évolution est parallèle à celle de l'animal normal. Les réponses sont systématiquement plus fortes chez l'épiphysectomisé, toutefois cette différence n'est si significative qu'à 21 et 40 jours. Ceci ressort clairement du tableau III qui résume les rapports des taux de gonadotropes hypophysaires entre l'animal normal et épiphysectomisé ( rapport d'activité mesuré directement ) où les intervalles de confiance (  $p < 0.05$  ) sont indiqués. A 50 et 80 jours la différence, qui diminue avec l'âge, n'est plus significative.

Dans le cas du castrat, l'hypophyse contient environ deux fois plus d'hormones gonadotropes que celle du témoin ( fig 18 ). En ce qui concerne la concentration des gonadotropines, on constate qu'elle atteint pratiquement sa valeur maximale dès l'âge de 21 jours. Des observations tout à fait semblables ont été rapportées par RAMIREZ et McCANN ( 1963 ).

Associée à la castration, l' épiphysectomie ne modifie que temporairement le contenu hypophysaire en gonadotropines par rapport à ce qu'il est chez le castrat. Elle a même moins d'effets que chez l'animal normal. La différence entre castrat et castrat épiphysectomisé, comme l'indique le tableau III, n'est significative qu'à 21 jours. Le phénomène est encore plus caractéristique dans le cas de la concentration des gonadotropines : la valeur maximale est atteinte dès 21 jours; une légère baisse est enregistrée par la suite et l'évolution devient très semblable à celle du castrat.

## Discussion et conclusions

Le contenu en hormones gonadotropes de l'hypophyse embryonnaire a été dosé chez le Porc en fin de gestation ( SMITH et DORTZBACH 1929 ) et plus récemment chez l'Homme ( MISKEVITCH et LEVINA 1965, LEVINA 1968 et RICE et coll. 1968 ). Chez le fœtus humain, LEVINA a montré que ce contenu est biologiquement décelable dans la seconde moitié de la gestation, qu'il est plus important chez la femelle que chez le mâle et qu'il diminue beaucoup chez l'embryon à terme.

Chez le Rat, CONTOPOULOS et SIMPSON ( 1957 ) n'ont pas pu détecter la présence de gonadotropes avant la naissance.

Aucun travail, à notre connaissance, n'a été publié sur ce sujet chez d'autres espèces de Muridés.

Nos résultats chez la Souris montrent qu'au moment où les premières cellules A. P. S. positives apparaissent dans l'adénohypophyse fœtale ( 16e jour ), les dosages révèlent l'existence des premières traces d'hormones gonadotropes. Par la suite ( 18e jour ), chez le mâle, alors que la réaction histochimique disparaît pratiquement dans l'hypophyse ( cellules offrant l'aspect dégranulé typique des gonadotropes ayant déchargé leur produit de sécrétion ), le contenu pituitaire n'augmente pas de façon significative contrairement à celui de la femelle. Cette dernière constatation est à rapprocher des mesures de LEVINA qui révèlent, chez l'embryon humain, une concentration en FSH et LH beaucoup plus forte chez la femelle que chez le mâle trois mois avant la naissance.

L'étude histochimique mettant en évidence, dès le 16e jour, la présence, dans certaines cellules hypophysaires, de nombreux granules A. P. S. positifs vraisemblablement en rapport avec un produit de sécrétion glycoprotidique ( GABE 1963 ), on constate que chez la Souris, comme chez le Lapin ( JOST et GONSE 1953 ), il semble exister une période importante de synthèse dans l'hypophyse embryonnaire; cette période est suivie d'une décharge des cellules A. P. S. positives au moment où, au niveau testiculaire, le tissu interstitiel passe par une phase à la fois de sensibilité maximum aux hormones gonadotropes ( cf chapitre V et VI ) et de très intense activité enzymatique et mitochondriale ( cf chapitre I ). En fin de gestation, chez la Souris comme chez le Lapin, la cytologie anté-hypophysaire révèle un aspect dégranulé A. P. S. négatif du parenchyme. Chez la Souris, cette étape A. P. S. négative correspond à une période de palier

quiescent dans le développement de la glande interstitielle testiculaire se prolongeant jusqu'au 5e jour post partum.

Signalons enfin au cours de l'embryogénèse humaine, l'existence d'un parallélisme très semblable entre l'évolution cytologique hypophysaire et celle de la glande diastématique aboutissant à la " crise génitale " du nouveau - né décrite par GAINET ( 1969 ).

Les dosages révèlent, contrairement à ce que laissait supposer l'aspect généralement A. P. S. négatif des coupes histochimiques, une augmentation significative du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes entre la naissance et le 5e jour. Cependant, cette augmentation est beaucoup plus marquée en valeur absolue au cours de la 2e et de la 3e semaine, parallèlement à la réapparition d'une intense réaction A. P. S. positive dans les cellules de type LH et FSH ( voir chapitre I et planche VII ).

La castration à la naissance chez le Rat mâle provoque dès le 18e jour une augmentation du taux d'hormones gonadotropes comme l'a démontré CLARK dès 1935. Chez le castrat adulte, l'accroissement du contenu gonadotrope porte avant tout sur le taux de LH ( voir article de revue dans DONOVAN 1966 ).

Les premiers signes histologiques d'une réponse hypophysaire à la castration néonatale chez le mâle apparaissent au 7e jour ( LIBMAN 1953 ). Les premiers signes d'une réponse pondérale se manifeste au 5e jour ( DES GOUTTES 1964 a et b ).

L'utilisation d'une méthode de dosage plus sensible vraisemblablement que celle de CLARK <sup>x)</sup> nous a permis de constater, dès le 12e jour, une augmentation du contenu en gonadotropes dans l'hypophyse du castrat à la naissance.

Ces résultats confirment une fois de plus l'existence précoce d'une action freinatrice des androgènes au niveau hypothalamo - hypophysaire.

L'épiphyséctomie pratiquée à la naissance n'a que peu d'effets sur le taux de gonadotropes hypophysaires, aussi bien chez l'animal entier que chez le castrat. Elle produit toutefois une augmentation systématique, souvent non significative, de ce taux. Aux âges de 21 et 40 jours cependant, cette différence est significative. Ces deux périodes coïncident avec un certain ralentissement de la croissance hypophysaire : crise du sevrage à 21 jours ( voir chapitre II ), arrêt de la croissance des " basophiles " correspondant à l'apparition des premiers

x) Implantation de l'hypophyse à doser chez une Souris femelle impubère.

spermatozoïdes dans l'épididyme à 40 jours ( LIBMAN 1953 ). Chez le castrat, la différence significative enregistrée au 21e jour s'atténue en fonction de la saturation en gonadotropes observée par la suite ( RAMIREZ et McCANN 1963 ).

Les estimations du contenu monoaminergique de l'hypothalamus permettront peut - être de préciser si cet effet de l'épiphysectomie est direct ( sur l'hypophyse ) ou s'il fait intervenir des relais hypothalamiques ou même d'autres centres nerveux.

En conclusion, l'effet temporaire ( ou statistiquement non significatif ) de l'épiphysectomie sur le contenu en gonadotropes hypophysaires au cours du développement confirme les résultats exposés dans le chapitre précédent et peut s'interpréter en faveur du rôle modulateur de la glande pinéale dans l'équilibre neuroendocrinien.

| Age (jours) | Animaux entiers |                  | Castrats |                |
|-------------|-----------------|------------------|----------|----------------|
| 12          | .90             | ≤ 1.06 ≤ 1.26    | .59      | ≤ 1.11 ≤ 2.12  |
| 21          | 1.17            | ≤ 1.56 ≤ 2.21 x  | 1.06     | ≤ 160 ≤ 2.50 x |
| 40          | 1.09            | ≤ 1.22 ≤ 1.43 xx | .89      | ≤ 1.19 ≤ 1.60  |
| 50          | .88             | ≤ 1.12 ≤ 1.52    | .80      | ≤ 1.01 ≤ 1.50  |
| 80          | .99             | ≤ 1.23 ≤ 1.63    | .70      | ≤ 1.08 ≤ 1.66  |

Tableau III : Contenu hypophysaire en hormones gonadotropes.  
Rapport Epiphysectomisé / Témoin chez le Rat mâle

Les valeurs moyennes sont encadrées par les limites de l'intervalle de confiance.

x : p < 0.05

xx : p < 0.01

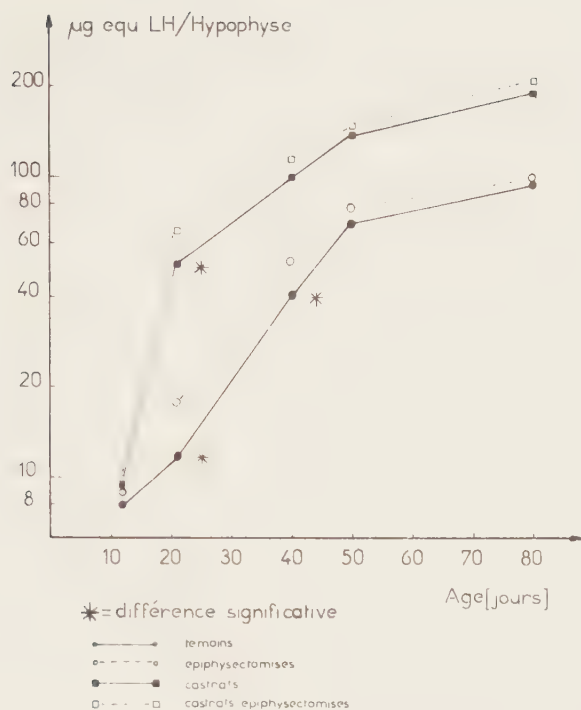


fig 18 Evolution du contenu hypophysaire en hormones gonadotropes chez le Rat mâle au cours du développement. Effet sur ce contenu de l'épiphyséctomie et de la castration à la naissance.

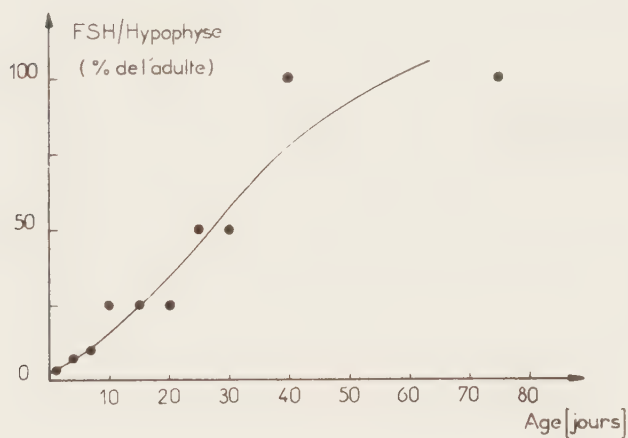


fig 19 Evolution du contenu hypophysaire en FSH chez le Rat mâle au cours du développement ( méthode de STEELMAN et POHLEY modifiée par MOSZKOWSKA ).



Deuxième partie

ETUDE IN VITRO



## Chapitre V

### ETUDE DU DEVELOPPEMENT IN VITRO DE LA GONADE

#### CHEZ LA SOURIS MALE .

#### Introduction

Dès 1952, E. WOLFF a obtenu la différenciation de la gonade embryonnaire de Souris en culture organotypique. Par la suite, ce résultat démontrant l'autonomie à l'égard du " milieu intérieur " des tissus appelés génétiquement à s'orienter vers une morphologie mâle, a été confirmé dans le travail de BORGHESE et VENINI ( 1956 ) et de SALZGEBER ( 1963 ). L'étude histologique montre ainsi la différenciation " de novo " de cordons testiculaires stériles; elle n'apporte pas d'informations sur le développement et l'activité fonctionnelle du tissu interstitiel formé dans ces conditions. Ce problème peut être abordé par l'étude in vitro de l'apparition de la fuchsinophilie caractéristique du chondriome et de la réaction  $\Delta^5 - 3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase dans les cellules de Leydig.

Les travaux de MARTINOVITCH ( 1937 et 1938 ) et ceux de WOLFF ( 1952 ) puis de BORGHESE et VENINI ( 1956 ) ont montré par ailleurs

que la gonade mâle de Souris embryonnaire, une fois différenciée, était capable de se développer en culture organotypique ( milieu an hormonal ) et de suivre pendant 3 - 6 jours une évolution comparable à celle du testicule in vivo :

a) Répartition dans les cordons des deux catégories cellulaires ( 1°. petites cellules épithéliales à la périphérie, 2°. cellules germinales à noyau et cyto - plasmе volumineux au centre ).

b) Diminution et interruption des mitoses dans les cellules germinales alors que les petites cellules continuent à se diviser.

En outre le testicule foetal explanté in vitro fait preuve d'activité sécrétrice : régression des canaux de Müller et biosynthèse d'androgènes à partir de précur - seurs radioactifs ( WENIGER 1964, WENIGER et coll. 1967 ); inhibition de la glande mammaire femelle associée in vitro à du testicule embryonnaire ( KRATOCHWIL 1969 ).

Chez le Rat, l'apparition et le développement de l'activité enzymatique  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  dans le tissu interstitiel testiculaire de l'embryon ont été obtenus en culture sur milieu synthétique liquide ( PICON 1967 ).

Afin d'étudier l'évolution histophysiologique et l'activité enzymatique du testicule foetal de Souris ainsi que sa réponse aux hormones hypophysaires, indépendamment de toute influence placentaire ou maternelle, nous avons eu recours aux méthodes d'explantation in vitro.

## I. Etude histologique

### Matériel et méthode

Les gonades ont été prélevées entre le 12e jour de gestation et le 7e jour post partum; elles ont été cultivées pendant 4 - 7 jours, seules ou en association directe soit avec des hypophyses embryonnaires ( 14e - 18e jour ), soit avec des fragments d'hypophyses adultes. Dans certains cas, les gonades explantées seules ont été associées à des fragments de tissu témoin ( myocarde ), dans d'autres cas elles ont été cultivées dans un milieu enrichi en hormones gonado - tropes hypophysaires ovines ( 2 - 10  $\mu\text{g/culture}$  ) hautement purifiées dans les services du Dr. JUTISZ ( C N R S, M1, RCP n° 59 ). Enfin, les gonades d'embryons à terme associées ou non à des fragments d'hypophyses adultes ont été cultivées en présence de vésicules séminales explantées au même stade ( 19e jour ).

Les tissus sont prélevés aseptiquement, disséqués sous binoculaire dans une solution à 50 % de tyrode et de milieu synthétique Eagle. Les explants ont été cultivés d'une part sur milieu gélosé standard ( WOLFF et HAFFEN 1952 ) légèrement modifié ( WOLFF et WOLFF 1952, LOSTROH 1960 ), d'autre part sur filtre Millipore selon une technique précédemment décrite ( GROBSTEIN 1956, 1964; LOMBARD et GROBSTEIN 1969 ), avec un milieu enrichi en jus embryonnaire ( 10 % ) et sur un support métallique ( modification SAXEN et coll. et TIXIER - VIDAL et GOURDJI ). Etant donné la fragilité du matériel ( en particulier dans le cas des associations avec des ébauches très jeunes ), seules les cultures prolongées sur gélose au-delà de 4 - 5 jours ont été repiquées sur milieu fraîchement préparé. L'examen des résultats histologiques ne révèle pas de différences appréciables selon le milieu de culture adopté.

Les techniques histologiques sont les mêmes que décrites précédemment ( cf chapitre I ).

### Résultats

L'analyse des coupes histologiques montre que :

1) Le développement du testicule embryonnaire cultivé seul se poursuit parallèlement à celui du testicule in vivo avec toutefois un certain retard. Ce retard est plus marqué quand les gonades sont prélevées très jeunes : après 3 jours en culture, la gonade en voie de différenciation prélevée à 12 ½ jours présente un développement comparable à celui du 14e jour in vivo ( planche XVIII fig 1 ). Dans les explants prélevés au 14e jour ( quand les cordons sont déjà bien formés et les cellules interstitielles très actives ) et cultivés 4 jours, les cordons sont comparables à ceux d'un embryon de 17 - 18 jours : les cellules germinales migrent vers la périphérie et prennent un aspect semblable à celui des petites cellules épithéliales. Les îlots de Leydig sont très fuchsinophiles ( certaines cellules ont un cytoplasme rétréci, fortement chromophile et un noyau d'aspect pycnotique, ce qui rappelle le début du " palier " de croissance du tissu interstitiel, voir chapitre I ). Dans les explants prélevés au 16e jour et cultivés 3 ½ jours, les cellules germinales sont nombreuses et l'interstitielle est en pleine activité, ce qui correspond au 18e jour in vivo. Les explants du même âge cultivés 7 jours ont l'aspect de testicules de nouveau-né : le centre de la plupart des cordons apparaît " stérile ", les plages de tissu interstitiel actif sont moins importantes

( phénomène de redistribution décrit au chapitre I ) et comprennent souvent des cellules à noyau pycnotique ( planche XIX fig 1 ).

2) Les gonades de 13 - 14 jours cultivées en présence d'hypophyses du même âge offrent l'aspect d'un développement semblable aux cultures témoins ( planche XVIII fig 3 et 5 ).

Seule la présence d'hypophyses embryonnaires prélevées après le 16e jour fait apparaître dans certains cas des images de développement accéléré ( croissance des cordons, nombre de mitoses dans l'interstitielle, augmentation de la taille et de la fuchsinophilie des cellules de Leydig : planche XIX fig 2 et 5 et planche IX fig 4 ).

Rappelons que c'est à partir du 16e jour seulement que les dosages hypophysaires ont révélé des traces d'hormones gonadotropes.

L'hypophyse embryonnaire, dès le 16e jour, s'avère capable de se développer elle aussi en culture ( apparition des premières cellules à prolactine après 4 - 5 jours in vitro, en l'absence d'hypothalamus ).

3) En présence d'hypophyse adulte, quel que soit le stade d'explantation de la gonade et le temps en culture, le nombre des mitoses dans les espaces interstitiels est augmenté ainsi que la taille des îlots et des cellules qui les constituent ( planche XVIII fig 4 et 6 ); la croissance des cordons est souvent stimulée également.

On remarque en outre que le testicule prélevé entre le 14e et le 19e jour semble particulièrement sensible à la présence d'hypophyse, les réponses les plus importantes étant toujours obtenues à ces âges - là. 14e jour : planche XVIII fig 5 et 6; 16e et 18e jour : planche XIX fig 3 et 6 ( comparer avec fig 1 et 4 ); 19e jour: planche IX fig 5 et 6 ( comparer avec fig 1 ).

4) L'aspect histologique des vésicules séminales du nouveau - né cultivées 5 jours en présence des associations testicule - hypophyse confirme pleinement les images d'activité décrites au niveau de l'interstitielle : en présence d'hypophyse embryonnaire le testicule nouveau - né est capable de stimuler légèrement par ses sécrétions in vitro l'épithélium vésiculaire ( planche X fig 4 ); cet épithélium, cultivé en présence du seul testicule, se développe moins bien ( pas de zones claires cytoplasmiques; à côté de cellules en mitose, bon nombre de noyaux ont pris un aspect pycnotique, planche X fig 3 ). Cultivée seule, la vésicule séminale apparaît totalement désorganisée ( cellules atrophiques et nécrosées ) ce qui montre que le testicule cultivé sans hypophyse garde une certaine activité autonome;

l'existence de cette activité est d'ailleurs confirmée par l'aspect non complètement régressé des cellules de Leydig.

En présence des associations testicule - hypophyse adulte, les vésicules ont un épithélium très stimulé ( hauteur, aspect du cytoplasme esquissant une zone claire vers la lumière, très nombreuses cinèses), planche X fig 1 et 5.

5) L'incorporation d'hormones gonadotropes purifiées dans le milieu montre qu'au moment de la différenciation sexuelle ( 12  $\frac{1}{2}$  jours ), les gonades ne paraissent pas répondre aux doses de FSH et LH fournies ( 6  $\mu$ g); planche XVIII fig 1 et 2 ).

Par contre, les mêmes doses, administrées au testicule en fin de gestation, provoquent une hyperplasie des cellules interstitielles dont le cytoplasme semble répondre à la stimulation en donnant des signes d'intense activité par rapport au témoin ( planche IX fig 1 et 2 ). Au niveau des cellules germinales, on remarque une augmentation du nombre des cinèses en présence d'hormones hypophysaires.

En présence de l'hormone FSH seule, nous avons obtenu non seulement une stimulation importante du développement des cordons et du nombre des gonocytes dans le testicule à terme cultivé 2  $\frac{1}{2}$  jours ( planche IX fig 3 ) mais aussi une réponse spectaculaire du tissu interstitiel après 7 jours de culture ( invasion luxuriante de tout l'explant par des cellules de Leydig hypertrophiées au maximum et bourrées de gros grains intensément fuchsinophiles, planche XIX fig 6 ).

## II. Etude histochimique

### Matériel et méthode

Les gonades ont été explantées entre le 9<sup>e</sup> jour ante partum et le 3<sup>e</sup> jour post partum. Les cultures sont effectuées dans les conditions décrites plus haut. Aucune différence appréciable n'a pu être relevée à l'étude histochimique selon le milieu utilisé ( gélosé ou liquide ). Les testicules ont été cultivés seuls ou en association directe soit avec des fragments de tissu témoin ( coeur ou membre embryonnaire ) soit avec du tissu hypophysaire adulte nouveau - né.

Les techniques histochimiques que nous avons utilisées ont été détaillées précédemment ( voir chapitre I ).

L'incubation dans le substrat ( prégénolone ou D H A ) a été prolongée à 2 h ou 2  $\frac{1}{2}$  h pour les gonades explantées avant la différenciation sexuelle.

Aucune réaction  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D n'a été observée dans le tissu associé, qu'il s'agisse d'hypophyse ou de tissu témoin.

D'autre part, nous avons effectué une série d'explantations de courte durée ( 1 - 12 h ) de testicules prélevés au 13e et au 18e jour de gestation. Ces testicules ont été incubés dans les mêmes conditions que les cultures en milieu liquide ( 37 ° ). Les milieux utilisés ont été cette fois additionnés d'une solution de 0.05 cc de tyrode contenant respectivement 2  $\mu$ g de LH, 4  $\mu$ g de FSH ou 2  $\mu$ g de LH + 4  $\mu$ g de FSH.

Les gonades témoins ont été incubées sur milieu additionné de 0.05 cc de tyrode seul.

De même que pour l'étude histologique, les hormones incorporées nous ont été fournies par le Dr. JUTISZ ( C N R S, M1 , RCP n° 59 ).

### Résultats

Dans l'ébauche de crête génitale explantée au 9e jour de gestation et cultivée pendant 3 - 4 jours, aucune structure en cordon et aucune activité  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D ne peut être décelée.

Ultérieurement, quel que soit le stade auquel la gonade a été prélevée, l'activité enzymatique des cellules de Leydig se développe en culture. On constate toutefois un certain retard par rapport au stade qui serait atteint " in vivo ". En présence d'hypophyse adulte, la réaction étant accentuée, ce retard est toujours réduit, parfois même complètement aboli.

Parmi les gonades explantées au 11e jour ( alors qu' " in vivo " aucune activité  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D n'est encore décelable ) et cultivées 4 jours, celles qui se sont différenciées en testicules font apparaître une réaction enzymatique entre les cordons qui se sont ébauchés " in vitro " ( planche XV fig 3 ). Les cellules interstitielles ne forment pas d'îlots mais sont groupées en une ou deux masses au centre de l'explant. L'activité enzymatique est comparable à celle du testicule de 12 ½ jours " in vivo ".

En présence d'hypophyse adulte, la réaction est renforcée ( plage plus dense et plus importante ), son intensité se rapproche de celle du testicule de 13 - 14 jours ( planche XV fig 2 ). Dans les deux catégories de cultures on remarque également la présence d'un certain dépôt de diformazan dans les cordons ( en particulier à la périphérie ).

Sur les coupes de gonades prélevées au 11e jour et cultivées 6 jours, on constate que la réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D, apparue "in vitro", s'accroît; sa localisation se précise entre les cordons qui se sont mieux dessinés. Ceci est plus évident encore dans le cas des associations testicule - hypophyse adulte ( planche XV fig 4 et 5 ).

Dans les gonades explantées au 12e jour, la réaction déjà amorcée "in vivo" est renforcée après 5 jours de culture en présence d'hypophyse.

Lorsque les testicules sont prélevés plus tard ( 14e jour ), alors que la réaction est déjà très nette, on constate qu'elle augmente encore fortement "in vitro"; cette augmentation est proportionnelle à la durée de la période en culture: 3 jours, 4 jours puis 7 jours. De même, la différence d'intensité de réaction entre testicules cultivés en présence ou en absence d'hypophyse s'avère maximum après une semaine de culture ( planche XVI fig 1 et 2 ). Dans le premier cas, la réponse histochimique est souvent même plus forte que celle des stades correspondant "in vivo" ( testicule de 3 jours post partum ), planche XVI fig 1, comparer à la planche V fig 4 . Il semble en effet qu'en culture et en présence d'hypophyse adulte, l'activité  $\Delta^5-3\beta$  - H S D dépasse le palier atteint "in vivo" en fin de gestation. Enfin, dans tous les explants, les cordons larges et sinueux se sont bien développés; ils sont toujours négatifs alors que certains, au moment de la mise en culture, contenaient quelques grains de diformazan. Dans les explants cultivés en présence d'hypophyse, la croissance des cordons paraît également stimulée ( planche XVI fig 1 ).

Explantés à 3 jours post partum ( stade auquel les cellules interstitielles sont réparties en petits groupes épars, certaines donnant l'impression d'être en période de repos ou même de dégénérescence ) et cultivés 3 jours, les testicules ne paraissent pas contenir des îlots plus importants ou plus actifs qu'au moment de leur prélèvement ( planche XVI fig 3 ). Par contre, en présence d'hypophyse adulte, on constate une légère mais distincte augmentation de la taille des plages de tissu interstitiel et de la concentration des grains de formazan dans les cellules ( planche XVI fig 4 ). Lorsque les testicules sont associés à des fragments d'hypophyse du même âge post partum, de telles modifications n'apparaissent pas. Rappelons à ce propos que, bien que les dosages hypophysaires montrent une certaine augmentation du taux de gonadotropes entre la naissance et le 5e jour, l'étude histochimique et histologique révèle des images de très faible activité sécrétoire gonadotrope précisément entre la fin de la gestation et le 5e jour

post partum. Cette dernière constatation est évidemment à rapprocher des résultats que nous venons d'exposer.

L'étude histochimique des testicules incubés pendant 1 - 12 h en présence ou en absence d'hormones gonadotropes montre qu'au 13e jour de la vie embryonnaire, l'activité enzymatique du tissu interstitiel n'est pas sensiblement modifiée par les facteurs hypophysaires au cours d'une aussi brève période. Par contre, au 18e jour de la gestation, les cellules de Leydig semblent avoir acquis une sensibilité très grande à la LH. En effet, après 1 h d'incubation en présence d'hormones, la moyenne des coupes montre déjà une réaction plus forte de la  $\Delta^5-3\beta$ -HSD que celle des coupes témoins ( planche XII fig 3, 4 et 1 ). La FSH seule ne paraît pas avoir eu d'action aussi rapide ( planche XII fig 5 ).

Après 1 h 30, l'effet est accentué; dans ce cas la FSH seule ( planche XIII fig 5 ), la LH seule ou la LH et la FSH associées ont provoqué des réponses analogues ( planche XII fig 3 et 4 ).

Après 12 h d'incubation, toutes les coupes ( testicules incubés avec ou sans gonadotropes ) ont une activité enzymatique plus forte; celle des testicules témoins ( planche XIV fig 1 ) reste en moyenne nettement inférieur à celle des stimulés qui offrent l'aspect d'une réaction d'intensité maximum dans tous les espaces interstitiels ( saturation ), planche XIV fig 3, 4 et 5.

Notons enfin qu'une certaine stimulation de la croissance des cordons se manifeste également après 12 h d'incubation en présence de l'hormone FSH ( planche XIV fig 5 ). D'autre part, l'étude histologique montre qu'après 1 h 30 en présence de LH, le cytoplasme des cellules de Leydig est hypertrophié et surchargé en inclusions lipidiques ( planche XI fig 2 et 5 ). Après 12 h d'incubation en présence de LH et de FSH, la taille des plages interstitielles a considérablement augmenté et les cellules sont bourrées de gros grains que colore intensément la fuchsine ( planche XI fig 3 et 6, comparer avec fig 1 et 4 ). Il semble donc qu'au cours des phénomènes successifs illustrant la réponse des cellules de Leydig à la stimulation gonadotrope, la surcharge cytoplasmique en vacuoles lipidiques représente une étape précédant l'apparition des signes d'activité sécrétoire mitochondriale.

## Discussion

Nos observations histologiques et histochimiques montrent que l'apparition première de la fuchsinophilie et de l'activité enzymatique  $\Delta^5-3\beta$  - H S D des cellules interstitielles peut s'effectuer " in vitro " en milieu semi - synthétique : l'apport en hormones gonadotropes du sérum et de l'extrait d'embryon de Poulet de 8 jours peut être considéré comme négligeable ( PICON 1967 n'a observé aucune différence du développement testiculaire en milieu synthétique ou semi - synthétique ).

Il semble donc que la très jeune gonade soit douée de propriétés intrinsèques de développement la rendant indépendante de toute stimulation gonadotrope extérieure. Ceci est confirmé par le fait que la gonade à ce stade - là ne paraît pas répondre aux doses d'hormones FSH et LH ( 6 - 8  $\mu$ g ) incorporées au milieu de culture.

Tout se passe comme si, conformément aux résultats obtenus par WOLFF en 1952, l'ébauche de gonade, au moment de sa constitution ( noyau épithélial, cellules germinales, mésenchyme ) contenait déjà les éléments essentiels à sa différenciation morphologique ( formation de cordons ) et physiologique ( activité enzymatique ou mitochondriale des cellules interstitielles ).

Cependant, par la suite, il semble que ce potentiel intrinsèque ne suffise plus à assurer seul le développement normal du testicule : les cordons formés sont pratiquement dépourvus de gonocytes ( aspect rappelant les images de cryptorchidie, WOLFF 1952, le volume du tissu de Leydig est beaucoup moins important et son activité est moins grande ). C'est précisément à ce moment - là ( 14e jour ) que la gonade mâle acquiert une certaine sensibilité aux hormones gonadotropes exogènes. Cette sensibilité augmentera pour atteindre un maximum à 18 jours, juste avant le début du palier de croissance gonadique ( cf chapitre I ). Les résultats de nos dosages hypophysaires montrent que ce seuil de sensibilité entre 14 et 18 jours paraît néanmoins trop élevé pour que la glande pituitaire embryonnaire " in situ " soit susceptible de contribuer à elle seule au développement explosif de l'interstitielle observé " in vivo " à ces stades - là. Un développement comparable ne se produit " in vitro " que moyennant un important apport en hormones gonadotropes : association avec deux fragments d'hypophyse mâle adulte ( 4  $\mu$ g de FSH ) ou incorporation d'hormones purifiées dans le milieu ( 4  $\mu$ g de FSH + 2  $\mu$ g de LH ). Ceci parle en faveur d'une stimulation

extérieure ( placentaire ? ) intervenant "in vivo" entre le 14e et le 18e jour de gestation.

Le fait qu' "in vitro", sous l'influence d'un apport en gonadotropes, le tissu interstitiel ne paraisse pas entrer après le 18e jour dans la période de repos physiologique que nous avons décrite ( chapitre I ) pourrait indiquer qu' "in vivo" cette période est due à une déficience des facteurs stimulateurs en question. Rappelons à ce propos que chez l' Homme, le contenu placentaire en hormones gonadotropes diminue fortement au cours du dernier tiers de la gestation ( voir références dans JOST 1966 ) et que le tissu interstitiel régresse de façon spectaculaire pendant les semaines qui précèdent la naissance ( GAINET 1969 ).

Nos observations concernant l'apparition tout au début de la différenciation testiculaire ( 12e jour ) d'une réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D dans les cordons en voie de formation aussi bien "in vitro" qu' "in vivo" posent le problème du rapport entre la présence de cette réaction modérée mais généralisée dans les cellules somatiques du noyau épithélial et sa localisation sélective dès le 13e jour dans les cellules interstitielles. On sait en effet que la question de l'origine des cellules interstitielles glandulaires dans les cordons testiculaires qui a été soulevée par BENOIT dès 1929, puis résolue chez l'embryon de Poulet ( SCHEIB et HAFFEN 1968, SCHEIB 1970 ) ne l'est pas encore pour le Mammifère.

L'apparition dans l'hypophyse embryonnaire prélevée au 16e jour et cultivée 4 jours des cellules érythrosinophiles ( au tétrachrome de Herlant ) du type LTH à prolactine, alors qu' "in vivo" ces cellules n'apparaissent que dans les jours qui suivent la naissance ( SANO et SASAKI 1969 ) est un argument indirect en faveur d'un contrôle hypothalamique inhibiteur ( PASTEELS 1963 ) s'exerçant "in vivo" en fin de gestation déjà.

Les images de développement des vésicules séminales que nous avons décrites "in vitro" sont à rapprocher de celles obtenues par POURREAU ( 1970 ), qui montrent l'aspect très actif de l'épithélium prostatique de Rat en culture avec différentes sources d'androgènes ( tumeur de la glande interstitielle de Rivière ou benzoate d'androstenedione ) alors que cet épithélium est mince, désorganisé et nécrosé quand il est cultivé seul.

L'augmentation du nombre de cellules germinales primordiales et de figures de mitoses dans ces cellules sous l'action in vitro des hormones hypophysaires purifiées ( 3 - 8  $\mu$ g ) rappelle les résultats de RAYNAUD et FRILLEY ( 1947 ) qui, après hypophysectomie foetale, obtiennent une diminution du nombre des

gonocytes dans les cordons testiculaires et qui concluent à l'existence possible d'une stimulation ( hormonale ) hypophysaire s'exerçant sur la multiplication des cellules germinales.

La prolifération spectaculaire et l'hyperstimulation des cellules de Leydig sous l'action in vitro de fortes doses de FSH pendant une semaine fait inévitablement penser aux résultats de RIVIERE ( 1962 ) qui a provoqué chez le Rat adulte une tumeur de l'interstitielle après traitement aux gonadotropes sériques.

Enfin, les incubations de courte durée en présence d'hormones gonadotropes permettent de suivre les phases successives de la réponse des cellules de Leydig explantées juste avant leur " mise en veilleuse " physiologique ( voir chapitre I ), au moment où leur seuil de sensibilité est très bas.

Il ressort de cette étude chronologique qu'à cette période de leur développement, les cellules interstitielles donnent déjà des signes d'activation enzymatique après 1 h - 1 h 30 en présence de l'hormone LH. Cytologiquement, cette première réponse semble se traduire avant tout par une surcharge cytoplasmique en inclusions lipidiques. La réponse histochimique, 11 h plus tard, est beaucoup plus forte et des signes d'intense fuchsinophilie mitochondriale sont apparus.

Ces résultats peuvent, dans une certaine mesure, être rapprochés de ceux obtenus sur le testicule de Souris adulte " in vivo " par différents auteurs. SLUITER ( 1943 et 1945 ) suggère l'existence d'un cycle sécrétoire de l'interstitielle correspondant à des aspects cytoplasmiques différents ( cette notion confirme les travaux de BENOIT ( 1929 ), elle a été reprise par MARSHALL, 1949 ( cité par GARNIER 1964 ) pour qui chez l'Oiseau les cellules de Leydig fuchsinophiles proviennent des cellules de Leydig lipofides, qui, elles-mêmes, dérivent des cellules de Leydig juvéniles.

HOVARDS et PELC ( 1949 ), par autoradiographie au  $^{32}\text{P}$ , mettent en évidence une relation possible entre les acides nucléiques et la sécrétion hormonale dans les cellules de Leydig. KOVACS ( 1960 ), après une injection sous-cutanée de 200 U.I. d' HCG, a observé des signes d'augmentation d' A R N dans le cytoplasme de ces cellules. HAMACHER ( 1968 ) obtient la reprise enzymatique, après 1 - 3 injections d' HCG, de l'interstitielle régressée après traitement aux oestrogènes.



## Chapitre VI

### INCORPORATION DE $^{32}\text{P}$ DANS LE TESTICULE DE SOURIS

#### IN VITRO .

#### Introduction

Cette partie de notre travail porte sur l'étude, "in vitro", de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  par le testicule embryonnaire de Souris explanté à différents stades du développement et sur la manière dont cette incorporation est influencée soit par l'adjonction d'hormones purifiées au milieu de culture, soit par la présence d'hypophyse ou de fragments d'hypophyse cultivés en association directe.

L'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les gonades d'Oiseaux et de Mammifères a été observée depuis longtemps. Dans le cas du Poussin nouveau-né, sa sensibilité aux hormones gonadotropes est à la base du test biologique que nous avons utilisé.

Les mécanismes qui peuvent être responsables de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  sont nombreux et, de ce fait, l'activité mesurée ne correspond pas à l'intensité d'une biosynthèse spécifique. Nous nous bornerons à énumérer brièvement les principaux processus, ce rappel pouvant nous guider dans l'interprétation de nos résultats.

Le phosphore intervient dans un très grand nombre de constituant de la cellule. Il est indispensable à la synthèse des acides nucléiques, puisque les nucléotides sont liés entre eux par des liaisons phosphodiester. Dans la plupart des transports d'énergie, les groupes phosphatés jouent un rôle clé. Les adénines riboses phosphatées ( AMP, ADP, ATP ) sont particulièrement importantes pour les métabolismes cellulaires. D'autre part, il semble établi que l'action de plusieurs hormones est propagée par une adényl cyclase, l'AMP cyclique ayant un rôle de messenger. Il existe beaucoup d'autres nucléosides qui peuvent se combiner à des groupes phosphates.

Enfin, les phospholipides constituent une classe importante de molécules qui contribuent, entre autres, à l'édification des membranes.

Ainsi, dans les tissus en développement, vu la variété des sites d'action possibles, le taux d'incorporation de  $^{32}\text{P}$  pourrait refléter un aspect du métabolisme général plutôt qu'une éventuelle action hormonale.

Chez le Mammifère, GOTHIE ( 1954 ) a montré par autoradiographie d'ovaires de Lapine que si les tissus en voie de croissance sont fortement marqués après injection de  $^{32}\text{P}$ , les tissus ayant une activité sécrétoire le sont également. Chez le Rat adulte, GAMBAL et ACKERMAN ( 1967 ) ont observé que les hormones gonadotropes FSH et LH ont une action au niveau des phospholipides testiculaires. D'autre part, chez le Rat impubère, ainsi que chez le Rat adulte hypophysectomisé, FSH stimule la biosynthèse des protéines du testicule, comme l'ont montré MEANS et HALL ( 1967 et 1968 ). Dans le cas du Rat adulte hypophysectomisé, cette stimulation s'accompagne d'une augmentation du taux d'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les phospholipides ( YOKOE et coll. 1969, YOKOE et HALL 1970 ), alors que d'autres hormones et notamment TSH, STH, prolactine et ACTH sont sans effet.

Comme nous le verrons, nos résultats s'inscrivent dans un schéma semblable, l'action des gonadotropes se traduisant par une stimulation de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  décelable dès les premiers stades du développement testiculaire.

### Matériel et méthode

Les gonades d'embryon de Souris sont prélevées et mises en culture comme précédemment ( cf chapitre V ). Après 18 - 19 h d'incubation, chaque culture est transférée sur un milieu additionné de 0.2 ml de liquide physiologique de Ringer contenant 1.2 - 1.5  $\mu$  Curie de  $^{32}\text{P}$ . A titre de contrôle, certains

explants sont transférés sur milieu non radioactif. Afin d'évaluer la vitesse d'incorporation, nous avons, au cours d'une série expérimentale, prélevé des explants après 3 h, 18 h, 24 h et 30 h d'incubation. Dans tous les autres cas, les cultures ont été interrompues 20 h après le transfert sur milieu radioactif; l'activité en  $^{32}\text{P}$  des organes explantés et séchés a été mesurée à l'aide d'un compteur Geiger. Les résultats sont soumis à l'analyse statistique. Celle-ci tient compte de la source d'erreur inhérente à la radioactivité qui suit la loi de Poisson : pour N désintégrations enregistrées, l'erreur probable est donnée par  $\pm\sqrt{N}$ .

### Résultats

Dans nos conditions expérimentales, l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  augmente régulièrement pour atteindre un maximum, ou tout au moins un palier après 20 - 22 h de culture sur milieu radioactif. Cette variation typique est illustrée par la fig 20 qui montre l'incorporation, dans le testicule explanté à 18 jours, en fonction du temps de culture sur milieu radioactif.

Un comportement semblable a été observé par MARINETTI et coll. (1958) en ce qui concerne l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  "in vivo" dans les phospholipides de divers tissus du Rat adulte. Dans des conditions expérimentales différentes des nôtres, il est intéressant de noter que ces auteurs ont rapporté, pour 3 types de phospholipides (lécithine, phosphatidyléthanolamine et sphingomyéline), une évolution en fonction du temps très semblable à celle que nous avons obtenue : quel que soit le tissu considéré (foie, rein, poumon, rate ou cœur), l'activité spécifique passe par un maximum (ou un plateau) après 20 h environ. Ce comportement pourrait donc être caractéristique de l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans les phospholipides.

L'incorporation de  $^{32}\text{P}$  doit être proportionnelle à la quantité de tissu cultivé. Si nous désignons par N le nombre d'atomes de  $^{32}\text{P}$  incorporés, cette proportionnalité s'exprime par la relation

$$N(q) = c \times q$$

où q représente la quantité de tissu et la constante c un taux d'incorporation spécifique. Comme le montre les fig 21 et 22, cette relation est bien vérifiée dans notre cas.

Il est intéressant de souligner qu'une action hormonale se traduira par une variation de la constante  $c$ , c'est - à - dire par un changement de pente de la droite décrivant l'activité mesurée en fonction de la quantité de tissu. Il est évident que l'activité cesse d'augmenter linéairement lorsque la quantité de tissu est telle que l'incorporation se fait principalement en surface et que les conditions de nutrition et d'oxygénation ne sont plus les mêmes au centre ou en périphérie de l'explant (diffusion ralentie vers l'intérieur du tissu. Il en est de même avec de trop fortes doses d'hormones ajoutées au milieu (intoxication); malgré l'augmentation du tissu on peut alors enregistrer une chute de l'incorporation.

Les figures 21 et 22 mettent également en évidence l'action des gonadotropines sur l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans la gonade explantée au 16<sup>e</sup> jour (fig 21) et au 18<sup>e</sup> jour de gestation (fig 22). Dans le premier cas, qui correspond à des cultures sur milieu gélosé, le rapport d'activité entre gonades cultivées en présence d'hormones gonadotropes (8  $\mu\text{g}$  de FSH et 4  $\mu\text{g}$  de LH) et gonades témoins est environ de 4, soit parmi les plus élevés que nous ayons observés.

Les gonadotropines n'ont aucun effet sur un tissu témoin comme le muscle (fig 22).

Pour une quantité constante de tissu, la loi de proportionnalité entre l'activité et le logarithme de la dose de gonadotropes additionnée au milieu

$$N(d) = \text{const.} \times \log(d),$$

où  $d$  représente la dose, est bien vérifiée dans le domaine des doses utilisées. Ceci est illustré dans la fig 23, dans le cas du testicule explanté à 19 jours antepartum. Les valeurs portées en abscisse correspondent à des doses allant de 0.5  $\mu\text{g}$  - 4  $\mu\text{g}$  pour FSH et 0.25  $\mu\text{g}$  - 2  $\mu\text{g}$  pour LH.

En ce qui concerne les autres hormones hypophysaires, nous avons constaté que STH n'agit qu'à des doses 100 fois plus fortes : les résultats de la fig 23 correspondent à des doses allant de 50  $\mu\text{g}$  - 400  $\mu\text{g}$  de STH; la pente de la droite réponse est nettement plus faible que celle de FSH ou de LH.

La prolactine également n'est stimulatrice qu'à dose élevée comme le montrent les résultats obtenus dans le cas du testicule explanté à 16 jours qui sont résumés dans le tableau IV. STH et prolactine n'ont pas non plus d'influence sur l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le cas du muscle <sup>x)</sup>. L'effet obtenu sur le testicule

<sup>x)</sup> Ces hormones purifiées nous ont été aimablement fournies par M. STOLIA - ROFF du centre de Recherches endocrinologiques des établissements Clin - Byla.

avec de fortes doses de ces hormones peut être le résultat soit d'activations métaboliques générales ( et dans le cas de l'hormone de croissance d'une hausse de l'index mitotique en particulier ) soit d'un apport suffisant de contamination gonadotrope dans ces hormones purifiées. A en juger par l'absence d'effet sur la réponse du muscle, cette dernière explication paraît la plus vraisemblable.

|                                     | Activité $^{32}\text{P}$<br>nb de coups / unité de temps<br>+<br>- erreur standard |        |    |
|-------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------|----|
| Testicule explanté à 16 jours       | 380                                                                                | +<br>- | 40 |
| T + 100 $\mu\text{g}$ de STH        | 786                                                                                | +<br>- | 55 |
| T + 160 $\mu\text{g}$ de prolactine | 780                                                                                | +<br>- | 60 |
| Muscle explanté à 16 jours          | 130                                                                                | +<br>- | 25 |
| M + 100 $\mu\text{g}$ de STH        | 98                                                                                 | +<br>- | 15 |
| M + 160 $\mu\text{g}$ de prolactine | 128                                                                                | +<br>- | 20 |

Tableau IV

Ces observations sont en accord avec les résultats de YOKOE et coll. ( 1969 ) concernant le Rat adulte hypophysectomisé et ceux de FLORSHEIM et coll. ( 1959 ) dans le cas du Poussin nouveau - né. Ceci indique que la stimulation de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule est un effet spécifique des gonadotropes pour des doses restreintes.

L'étude de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  en fonction du stade embryonnaire ou post partum auquel est explanté la gonade montre un accroissement parallèle au développement, c'est - à - dire une incorporation spécifique approximativement constante. La stimulation par l'addition de gonadotropes au milieu de culture est décelable dès les premiers stades ( 12e - 13e jour ), comme on peut le constater sur les fig 24 et 25, représentant des cultures de quantité constante de tissu, indépendamment de l'âge ( la fraction de testicule mise en culture diminuant avec l'âge ). La stimulation par les gonadotropes augmente légèrement avec l'âge.

Dans le cas de la gonade explantée à 16 jours, la fig 25 laisse entrevoir une réponse plus faible à la stimulation gonadotrope. Ceci apparaît également dans les résultats du tableau V provenant de trois séries de cultures effectuées indépendamment :

| Rapport de l'activité<br>en $^{32}\text{P}$<br>( $\pm$ erreur type ) | 14 j      | 16 j      | 19 j      | 7 j post partum |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------|
| Testicule + FSH - LH                                                 | 1.70      | 1.30      | 2.50      | 3.35            |
| Testicule                                                            | $\pm$ .25 | $\pm$ .15 | $\pm$ .30 | $\pm$ .35       |

Tableau V

L'étude histologique indique que l'interstitielle explantée à 16 jours ne donne des signes d'activation en présence d'hormones gonadotropes qu'après action prolongée : culture de 7 jours ( voir planche XIX fig 1, 2 et 3 ). La sensibilité à ce stade - là est moins grande qu'à 18 jours ( planche XIX fig 4, 5 et 6 ). L'aspect histologique des testicules de 18 jours ( planche XVII ) cultivés dans les mêmes conditions et pendant le même temps que les cultures en présence de  $^{32}\text{P}$  ( 35 h ) montre qu'à la stimulation cytologique due aux hormones LH ( fig 2 ), FSH ( fig 3 et 4 ) et FSH + LH ( fig 5 et 6 ) correspond l'augmentation d'incorporation du  $^{32}\text{P}$  respectivement.

L'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule est également stimulée par l'hypophyse mâle adulte cultivée en étroite association avec la gonade ( fig 26 ). Cette stimulation, particulièrement nette pour la gonade explantée au 17e jour, révèle, dans nos conditions expérimentales, l'existence d'une excrétion gonadotrope en l'absence de l'hypothalamus. Enfin, comme le montre la fig 27, l'hypophyse à différents stades de la vie embryonnaire se révèle elle aussi capable de stimuler sensiblement l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule. Toutefois cette stimulation n'est significative qu'à partir du 16e jour; elle croît lentement jusqu'au 7e jour post partum.

Nos résultats démontrent donc, une fois de plus, la sensibilité de la gonade embryonnaire aux hormones gonadotropes, sensibilité qui évolue avec l'âge et se manifeste en culture " *in vitro* " par une augmentation de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  additionné au milieu. Il nous a semblé par conséquent intéressant de compléter ce travail en étudiant les effets d'un facteur épiphysaire antigonadotrope sur

cette incorporation.

Influence du facteur épiphysaire  $F_3$  en culture sur l'incorporation du  $^{32}P$  dans la gonade de Souris mâle.

Les travaux de MOSZKOWSKA ( 1965 ) ont mis en évidence en culture organotypique l'existence d'un antagonisme épiphyso - hypophysaire portant sur la fonction gonadotrope. L'extraction biochimique et la purification d'un facteur inhibiteur ont été effectuées et son activité a pu être vérifiée en incubation " *in vitro* " ( EBELS et coll. 1965 ).

Etant donné la sensibilité aux hormones gonadotropes purifiées ( FSH et LH ovines) de la gonade embryonnaire de Souris mâle explantée dès le 15e - 16e jour de gestation, nous avons entrepris une étude des effets de la fraction épiphysaire ( ovine )  $F_3$  antigonadotrope incorporée dans le milieu de culture pendant 36 h .

Selon la méthode précédemment décrite, la réponse à la stimulation gonadotrope est mesurée par l'incorporation du  $^{32}P$  dans le testicule. Nous avons fait en parallèle l'examen histologique des différentes séries étudiées sur des échantillons non marqués.

Les propriétés de la fraction  $F_3$  étant très vite altérées nous avons renouvelé la dose après 12 - 16 h d'incubation.

Au cours d'une première série d'expériences, nous avons incorporé la fraction  $F_3$  antigonadotrope dans le milieu sur lequel étaient cultivés des fragments d'hypophyse mâle adulte en présence :

- 1°) De demi testicules embryonnaires prélevés au 16e jour de gestation ( à ce stade le tissu interstitiel de Leydig développe une intense activité enzymatique).
- 2°) Des demi testicules de la même portée en présence d'hormones gonadotropes purifiées FSH et LH (  $1 \mu g$  / culture ).
- 3°) De tissu musculaire lisse d'embryon de 16 jours également ( fragment de taille comparable aux fragments de gonade ).

Nous avons mesuré l'incorporation de  $^{32}P$  dans les gonades cultivées sur milieu soit dépourvu de  $F_3$  ( témoin ), soit additionné de 0.13 ou de 0.26 mg de  $F_3$  par gonade.

Les résultats sont rapportés dans le tableau VI, les moyennes correspondent à 8 - 10 mesures comprenant 4 - 5 explants.

|                   | Testicule de 16 j. | Testicule de 16 j.<br>+ hyp. mâle ad. | Testicule de 16 j.<br>+ FSH - LH |
|-------------------|--------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| Témoin            | 190 $\pm$ 14       | 300 $\pm$ 20                          | 293 $\pm$ 20                     |
| F <sub>3</sub> II |                    | 178 $\pm$ 15                          | 196 $\pm$ 16                     |
| F <sub>3</sub> I  |                    | 380 $\pm$ 25                          | 190 $\pm$ 18                     |

Tableau VI ( Unités : nb de coups / min ; les chiffres indiqués correspondent à la moyenne  $\pm$  erreur type ; Doses : F<sub>3</sub> I = 0.26 mg / cult. , F<sub>3</sub> II = 0.13 mg / cult. ).

On constate que la stimulation gonadotrope de l'hypophyse mâle adulte ou des extraits purifiés FSH et LH est fortement freinée, voire supprimée, par une dose faible de facteur F<sub>3</sub>. En présence d'une dose deux fois plus concentrée d'extraits épiphysaires, l'effet inhibiteur sur l'hypophyse n'est plus observé; ceci peut s'expliquer par l'apport d'un surcroît en acides aminés ( tyrosine ou tryptophane ) contenus dans la fraction F<sub>3</sub> ou par la formation d'un excès de métabolites, compétiteurs de l'inhibition, accumulés au cours de l'incubation. Par contre, l'inhibition directe de l'action des hormones gonadotropes purifiées est maintenue.

Quelle que soit la dose incorporée dans le milieu, la présence de F<sub>3</sub> ne modifie pas le taux d'incorporation d'un tissu non récepteur aux gonadotropes tel que la musculature lisse.

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons cultivé en présence ou en absence de la fraction F<sub>3</sub> des demi testicules de fœtus à terme ( 19e - 20e jour ) associés à 2 fragments d'hypophyse mâle adulte. Les résultats, résumés dans le tableau VII, montrent qu'à ce stade du développement, le testicule donne des réponses beaucoup plus fortes que celles de la gonade de 16 jours. D'autre part, l'inhibition par le facteur F<sub>3</sub> s'avère moins efficace. De même que précédemment, aucune activité inhibitrice n'est obtenue avec la dose forte de F<sub>3</sub>.

|                                          |                |
|------------------------------------------|----------------|
| Testicule 19 - 20 jours                  | 900 $\pm$ 130  |
| T + hyp. mâle adulte                     | 1350 $\pm$ 90  |
| T + hyp. mâle adulte + F <sub>3</sub> II | 1129 $\pm$ 55  |
| T + hyp. mâle adulte + F <sub>3</sub> I  | 1471 $\pm$ 105 |

Tableau VII ( Unités et doses : voir tableau VI )

Nous avons également, dans un certain nombre de cas, mis en culture l'hypophyse, la gonade et un récepteur ( la vésicule séminale de l'embryon à terme ). En prolongeant à 5 jours le temps en culture, l'inhibition par le facteur  $F_3$  ( dose faible ) est encore sensible :

|                                 |              |
|---------------------------------|--------------|
| Testicule 19 - 20 jours         | 146 $\pm$ 14 |
| T + hyp. mâle adulte            | 186 $\pm$ 16 |
| T + hyp. mâle adulte + $F_3$ II | 145 $\pm$ 13 |

Tableau VIII Les vésicules séminales cultivées en association n'incorporent qu'une quantité absolument négligeable de  $^{32}P$ . ( Unités et dose : voir tableau VI ).

L'étude histologique des vésicules séminales ( planche X ) apporte une confirmation de l'action de  $F_3$  sur l'excrétion gonadotrope du fragment hypophysaire : la production d'androgènes par le testicule cultivé en présence de ce fragment ( fig 2 et 6 ) ne suffit plus à maintenir la hauteur de l'épithélium vésiculaire observée dans les fig 1 et 5.

Dans une dernière série expérimentale, nous avons cultivé pendant 4 jours des quarts de testicules prélevés à la naissance. Chaque fragment de testicule a été associé à 2 demi hypophyses de nouveau - né.

|                                                               |               |
|---------------------------------------------------------------|---------------|
| Testicule nouveau - né<br>+ hypophyse nouveau - né            | 1175 $\pm$ 40 |
| Testicule nouveau - né<br>+ hypophyse nouveau - né + $F_3$ II | 637 $\pm$ 30  |
| Testicule nouveau - né<br>+ hypophyse nouveau - né + $F_3$ I  | 1396 $\pm$ 55 |

Tableau IX ( Unités et doses, voir tableau VI )

On constate ici encore que  $F_3$  administré en dose faible est capable d'inhiber la réponse à la stimulation gonadotrope ( cette fois de la propre hypophyse du nouveau - né in vitro ).

## Discussion

L'incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans la gonade de Souris mâle in vitro confirme les résultats histologiques et histochimiques exposés aux chapitres précédents, démontrant la sensibilité aux gonadotropes du testicule embryonnaire dès les premiers stades de sa différenciation. La réceptivité de la gonade en développement étant particulièrement bien démontrée à l'aide du  $^{32}\text{P}$ , elle pose évidemment le problème fondamental du ou des points d'impact des hormones gonadostimulantes au niveau du tissu récepteur. Chez le Rat adulte, les techniques biochimiques révèlent que ces hormones agissent au niveau des phospholipides testiculaires ( GAMBAL et ACKERMAN 1967, YOKOE et HALL 1970 ). Rappelons, dans ce contexte, que notre étude cytologique des gonades embryonnaires stimulées in vitro indique une action des gonadotropes en particulier sur la cellule interstitielle ( hyperplasie, abondance de vacuoles lipidiques, fuchsinophilie mitochondriale ). Cependant, ces premières observations demandant à être confirmées à l'aide d'autres méthodes, il serait encore prématuré d'établir certaines analogies entre les phénomènes décrits chez l'adulte et ceux qui se déroulent dans le testicule en voie de développement.

Le fait que l'hypophyse mâle adulte, cultivée en association directe avec le testicule, s'avère capable de stimuler l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  prouve une fois de plus que, privée de toute connection avec l'hypothalamus, la glande pituitaire des Rongeurs conserve une activité excrétrice pendant un certain temps ( ici 36 h ). Ceci confirme les résultats de MARTINOVITCH ( 1954 ), MOSZKOWSKA ( 1961 ), PETROVIC ( 1961, 1963 ) et BOUSQUET et MEUNIER ( 1968 ) qui, dans différentes conditions expérimentales, constatent l'autonomie du pouvoir sécréto - excréteur de l'adénohypophyse lorsque la période en culture n'excède pas 3 - 4 jours. Quant à l'hypophyse foetale, son action sur l'incorporation de  $^{32}\text{P}$  dans la gonade associée in vitro est plus faible mais néanmoins décelable; elle augmente régulièrement avec l'âge jusqu'au 7e jour post partum. Rappelons ici, que chez l'embryon de Poulet, l'existence d'une autodifférenciation hypophysaire a été démontrée pour la fonction thyroïdienne en particulier ( TIXIER - VIDAL 1958 ).

Enfin, nos résultats montrent qu'un extrait épiphysaire purifié est capable de bloquer la stimulation de l'incorporation du  $^{32}\text{P}$  par son action inhibitrice sur l'hypophyse ou sur les gonadotropes une fois excrétées.

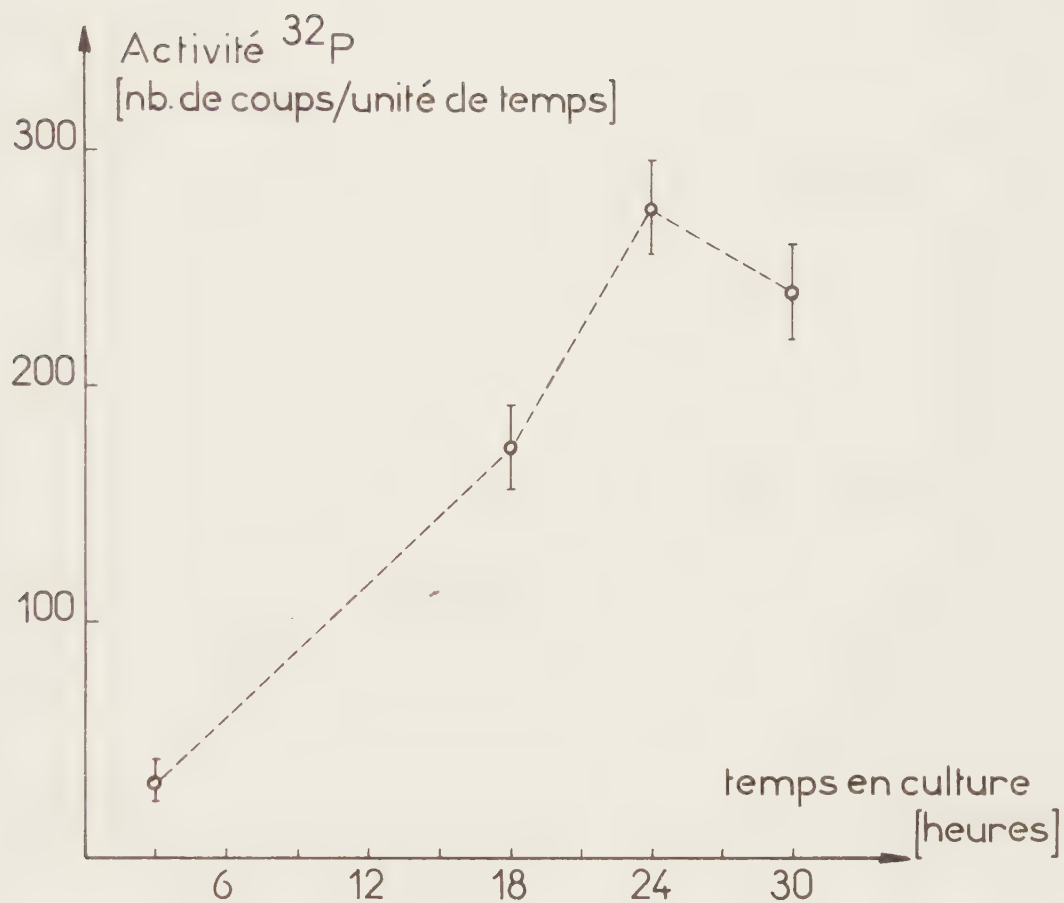


fig 20 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule explanté au 18<sup>e</sup> jour de gestation en fonction du temps de culture en présence de  $^{32}\text{P}$  additionné au milieu. Les barres verticales représentent les erreurs - type.

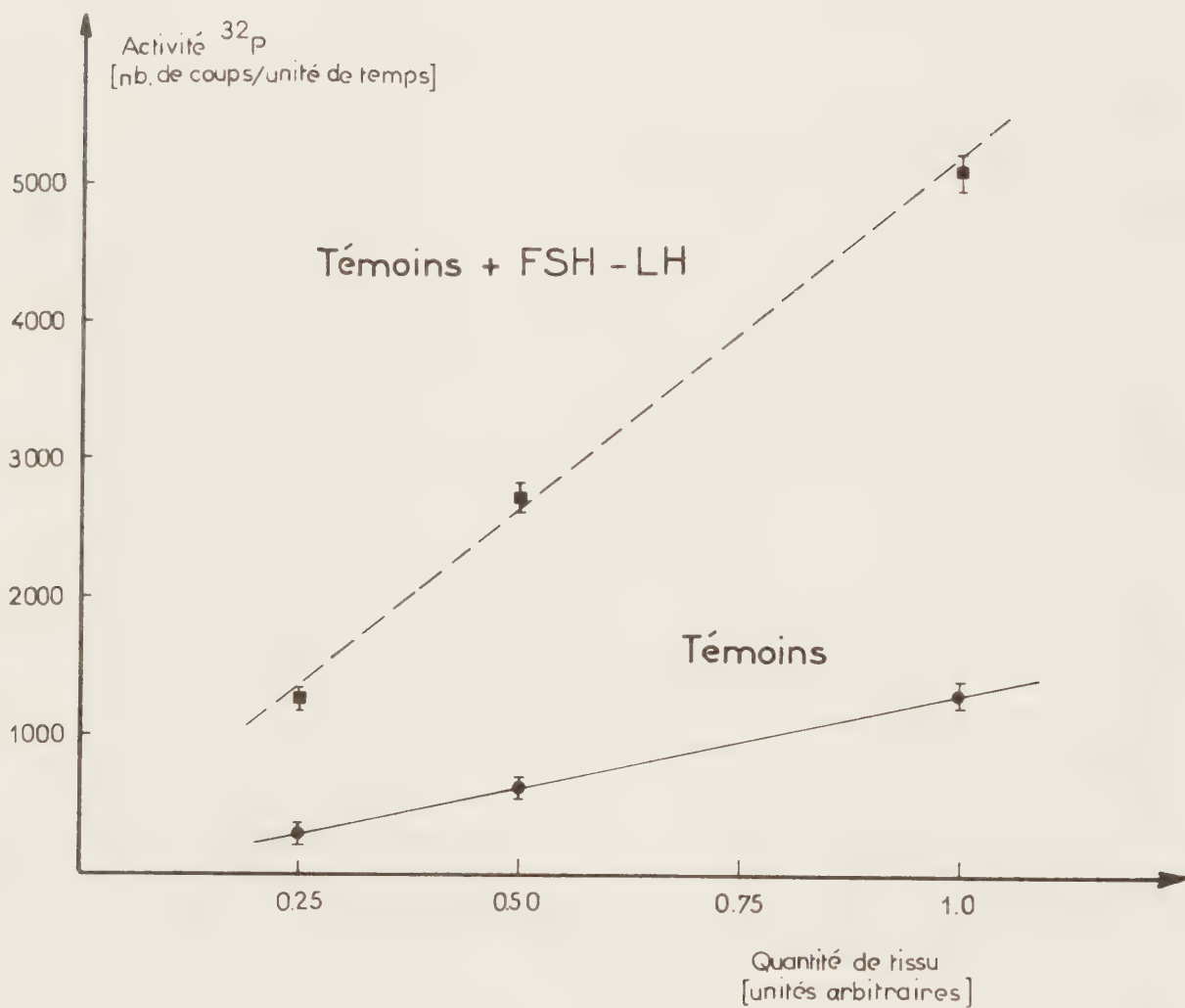


fig 21 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule explanté au 16<sup>e</sup> jour de gestation en fonction de la quantité de tissu. L'adjonction d'hormones gonadotropes purifiées FSH et LH stimule l'incorporation du  $^{32}\text{P}$ . Les barres verticales représentent les erreurs - type.

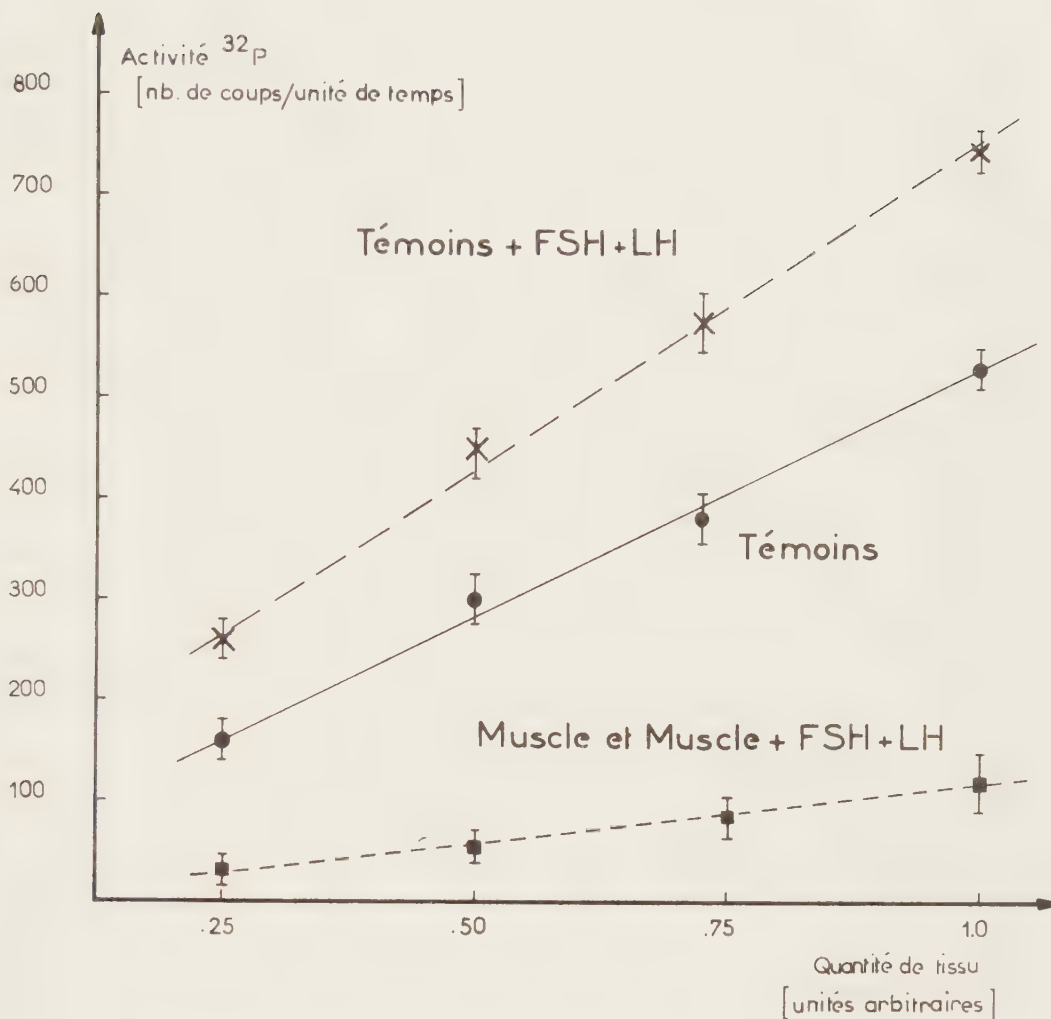


fig 22 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule explanté au 18<sup>e</sup> jour de gestation en fonction de la quantité de tissu cultivé. L'adjonction d'hormones gonadotropes purifiées (  $8\mu\text{g}$  FSH +  $4\mu\text{g}$  LH ) stimule l'incorporation. A quantités de tissu égales l'incorporation est nettement plus faible dans le muscle et ne répond pas aux gonadotropes. Les barres verticales représentent les erreurs - type.

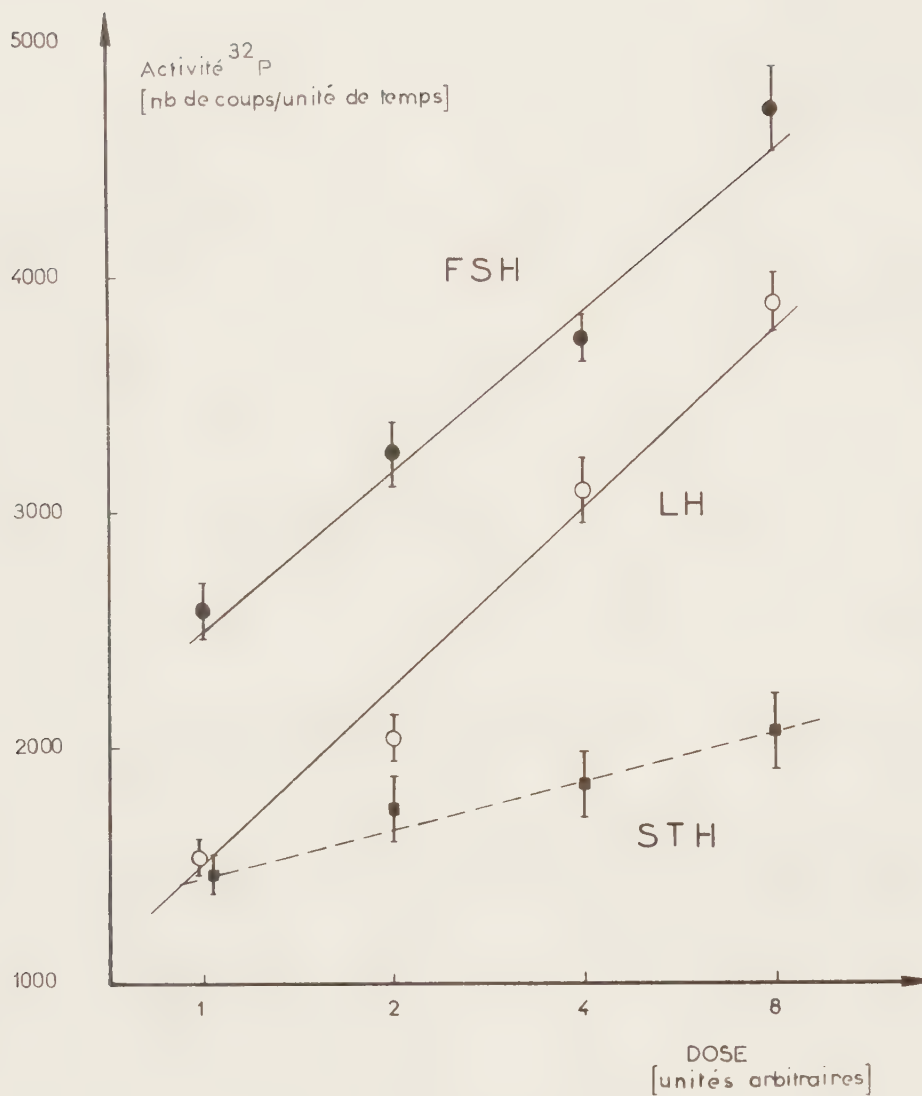


fig 23 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule explanté au 18e jour en fonction de la dose d'hormone purifiée ajoutée au milieu de culture. Les doses unités sont : FSH : 0.5  $\mu\text{g}$ ; LH : 0.25  $\mu\text{g}$ ; STH : 50  $\mu\text{g}$ . Les barres verticales représentent les erreurs - type.

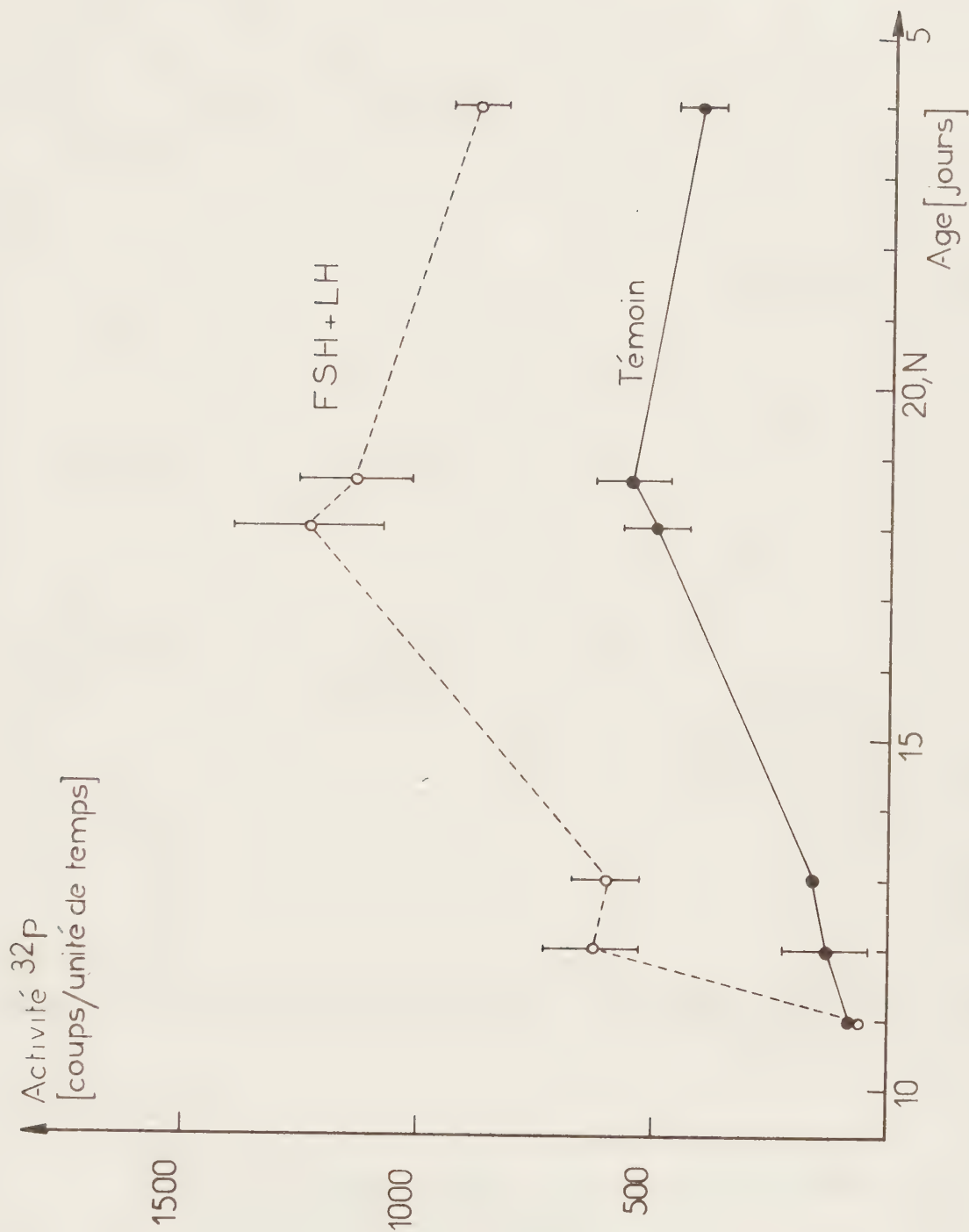


fig 24 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule en fonction de l'âge de l'explant .  
 La courbe en pointillé correspond à une adjonction de  $8\mu\text{g}$  de FSH et de  $4\mu\text{g}$  de LH au milieu de culture. ( la quantité de tissu est constante).  
 Les barres verticales représentent les erreurs - type.

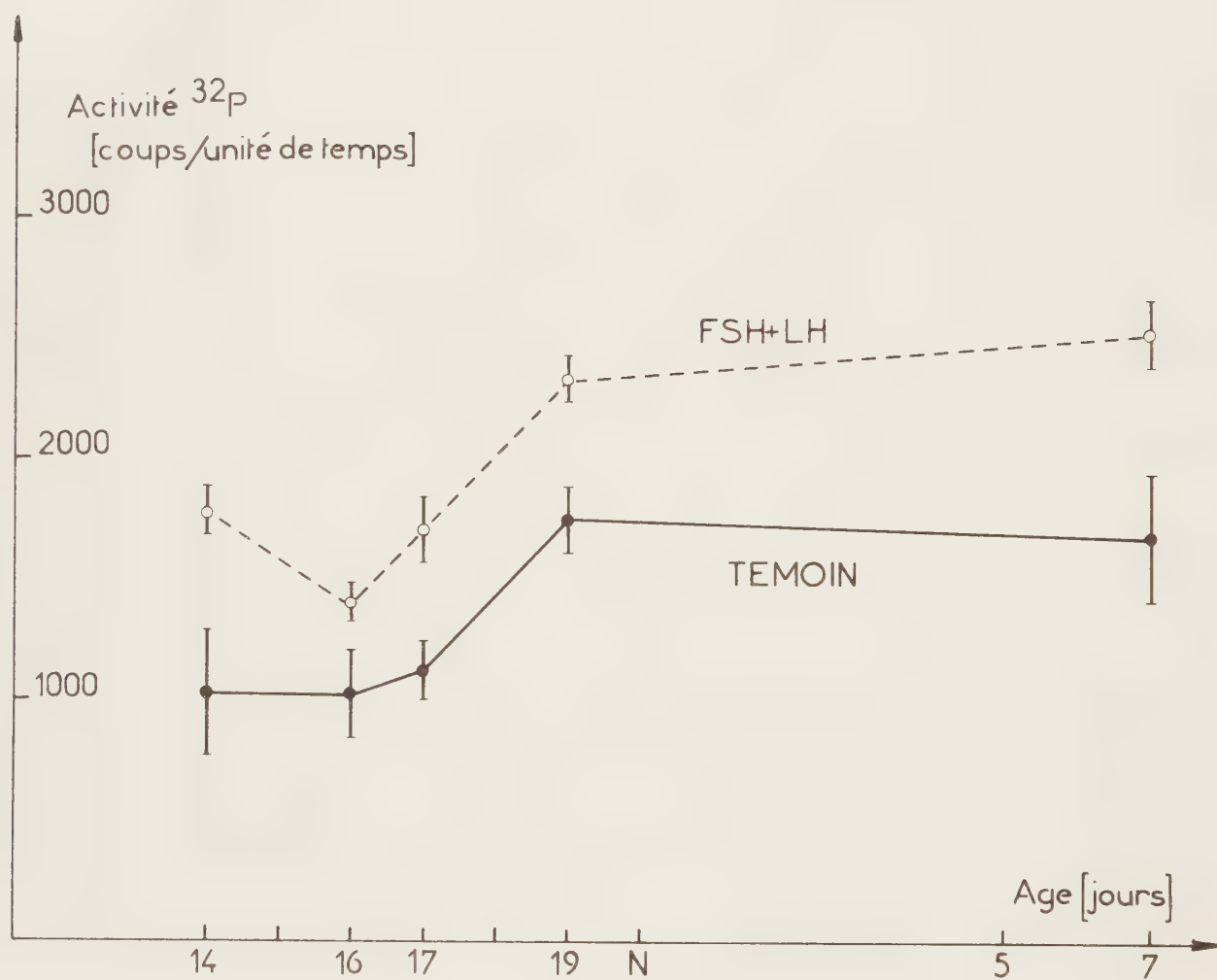


fig 25 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule en fonction de l'âge de l'explant.  
 La courbe en pointillé correspond à une adjonction de  $4\mu\text{g}$  de FSH et de  $2\mu\text{g}$  de LH au milieu de culture. ( La quantité de tissu est constante ).  
 Les barres verticales représentent les erreurs - type.

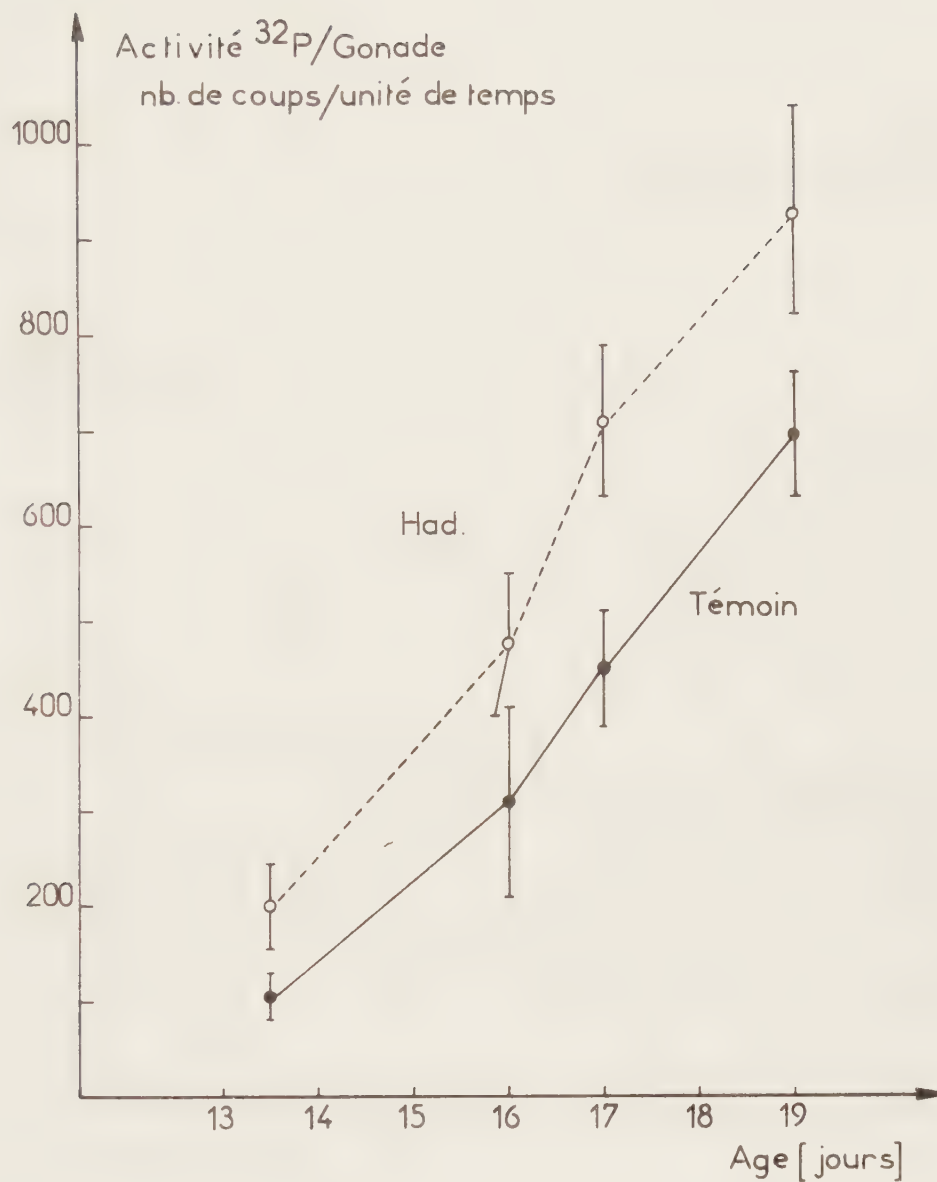


fig 26 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule cultivé en association avec des fragments d'hypophyse mâle adulte ( Had ) en fonction de l'âge de l'explant. Les barres verticales représentent les erreurs - type.

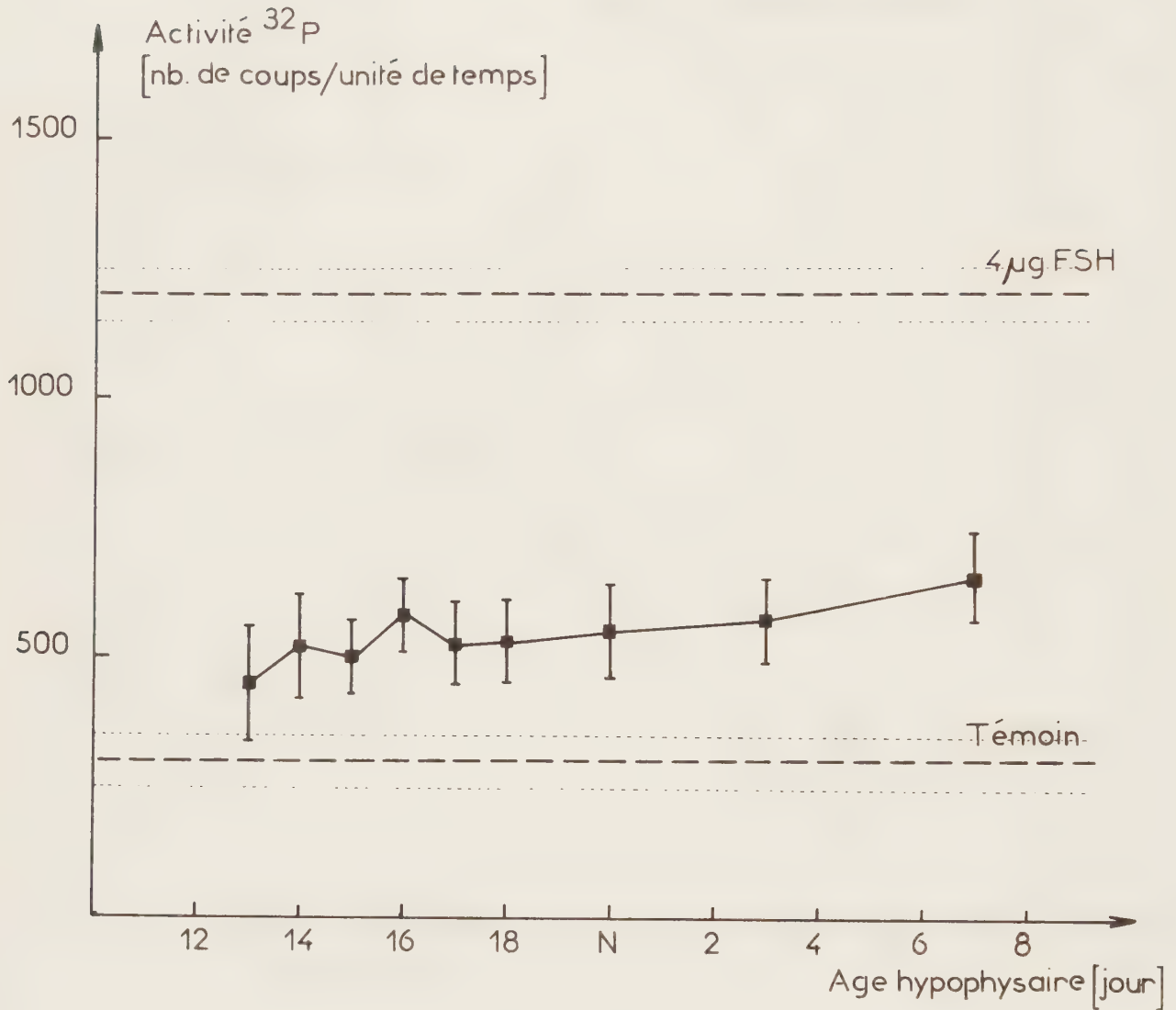


fig 27 Incorporation du  $^{32}\text{P}$  dans le testicule explanté à 18 jours cultivé en association avec l'hypophyse explantée à différents stades. Les barres verticales représentent les erreurs - type.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

Au terme de cette étude, dont le but était de situer certaines étapes du développement de la gonade mâle dans le contexte neurohormonal susceptible d'intervenir au cours de leur enchaînement, nous sommes amenés à formuler les conclusions suivantes :

### I. Au cours du développement embryonnaire

Chez la Souris, la différenciation sexuelle de la gonade en testicule est décelable histoenzymologiquement 10 - 12 h avant l'apparition des premiers signes morphologiques de cette différenciation ( 12e jour de gestation ). L'activité d'une enzyme intervenant dans la biosynthèse des stéroïdes, la  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxy-stéroïde déshydrogénase, peut être localisée dans les cellules interstitielles au cours des 24 h qui précèdent leur acquisition de caractères cytoplasmiques distinctifs ( fuchsinophilie mitochondriale ). En culture organotypique, ces cellules, explantées au 10e jour de la vie foetale, font preuve de capacité d'autodifférenciation, ce qui confirme et étend les travaux de E. WOLFF ( 1952 ). Toutefois, ce n'est qu'en présence d'un apport gonadotrope ( association in vitro avec des fragments d'hypophyse adulte ou adjonction au milieu de culture d'importantes doses d'hormones purifiées FSH - LH ) que cette différenciation peut franchir certaines étapes : prolifération explosive de l'interstitielle se produisant in situ au 14e jour ante partum.

Le rôle stimulateur des hormones gonadotropes sur l'activité enzymatique testiculaire  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  a déjà été constaté chez les Batraciens ( PESONEN et RAPOLA 1962, " *Xenopus laevis* ", et CHIEFFI et BOTTE 1963, " *Rana esculenta* " ). Le fait que l'hypophyse in situ n'intervienne pas dans les processus initiaux de différenciation testiculaire a également été démontré chez les Amphibiens ( MINTZ et GALLIEN 1951 et 1954 ), alors que, chez l'adulte, dès 1938, GALLIEN a décrit la régression du tissu interstitiel après hypophysectomie. In vivo, chez le Mammifère comme dans d'autres classes de Vertébrés, la sensibilité de la gonade à l'égard des hormones FSH et LH augmente donc après la différenciation sexuelle, parallèlement, semble - t - il, à l'augmentation du contenu hypophysaire en gonadotropes.

La présence, dans la gonade indifférenciée, d'une enzyme indiquant la possibilité d'une synthèse locale d'hormones stéroïdes ( BREUER et OZON 1965 ) aussi bien chez " *Pleurodeles waltlii* " ( COLLENOT 1964 ) que chez le Poulet ( SCHEIB et HAFFEN 1967 ) et chez la Souris ( SCHEIB et LOMBARD 1970 ) soulève la question de l'intervention possible, à un stade très précoce, de ces hormones qui sont dosables dans la gonade en voie de différenciation ou déjà différenciée ( GALLIEN et CHALUMEAU LE FOULGOC 1960, chez " *Xenopus* "; GALLIEN et LE FOULGOC 1958, HAFFEN et CEDAR 1968, chez le Poulet; NOUMURA et coll. 1966, chez le Rat ).

Nos résultats chez la Souris mettent en évidence la différence particulièrement nette entre la présence précoce de la  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  dans la future gonade mâle et son apparition beaucoup plus tardive dans l'ovaire en fin de gestation. SCHEIB et HAFFEN ( 1969 ) ont montré que chez l'Oiseau ( Caille ou Poulet ), si l'enzyme apparaît à la fois dans les ébauches de gonades mâle et femelle, sa présence est plus discrète dans le testicule présumé, et son activité moindre par la suite dans les cellules interstitielles mâles que dans l'ovaire. Ces constatations amènent évidemment à poser une fois de plus le problème de la relation entre la nature du substrat génétique ( le mâle étant hétérogamétique chez les Mammifères, homogamétique chez les Oiseaux ) et la réceptivité à une induction intrinsèque épigénétique, ici à l'influence éventuelle des stéroïdes dans le déroulement des processus de différenciation sexuelle, correspondant au type XY ou s'opposant au type XX.

La question du rôle des facteurs épigénétiques agissant en synergie avec les facteurs génétiques a été analysée de façon détaillée par WOLFF ( 1964 ),

GALLIEN ( 1965 ) et COLLENOT ( 1965 ). Il convient de rappeler à ce propos l'action inhibitrice de l'oestradiol exogène sur l'apparition de l'activité  $\Delta^5-3\beta$  - H S D ( COLLENOT 1964, RAYNAUD et coll. 1967 ).

Ce problème se rattache à celui de l'origine des cellules productrices de stéroïdes sexuels. La présence de  $\Delta^5-3\beta$  - H S D ou de cellules à chondriome très fuchsinophile dans les ébauches des cordons sexuels ( CHIEFFI 1965, RAYNAUD et coll. 1967 chez l'Oiseau; BAILLIE et coll. 1966, SCHEIB et LOMBARD 1970, chez le Mammifère ) peut être interprétée en faveur de l'origine épithéliale du tissu responsable de la fonction endocrine testiculaire. Le rôle que cette fonction très précoce pourrait exercer sur les cellules germinales soit au moment où, arrivées dans la crête génitale, elles entrent en division ( MINTZ 1957 ), soit déjà en tant qu'agent chimiotactique au moment de la migration des gonocytes ( WILLIER 1939, WITSCHI 1948, JOHNSTON 1951 et DUBOIS 1967 ) pose une série de questions encore difficiles à résoudre. Signaux, dans ce contexte, que chez les Amphibiens, le traitement des mâles génétiques au benzoate d'oestradiol arrête la migration des cellules germinales ( COLLENOT 1965 ).

Nos résultats chez la Souris indiquent que, peu après la différenciation sexuelle, l'évolution embryonnaire de la gonade mâle est caractérisée par l'extension rapide et l'intense activité du tissu interstitiel glandulaire, précédant le démarrage du premier cycle spermatogénétique dans les cordons. L'existence de cette dissociation spermatodiasématique suggère ici encore une influence de la sécrétion d'androgènes sur le tissu germinatif.

Cette influence intervient vraisemblablement en synergie avec les facteurs gonadotropes ( hypophysaires ou placentaires ? ).

En effet, l'aspect histologique et histochimique de l'hypophyse embryonnaire révèle l'existence d'un certain parallélisme entre l'évolution de l'hypophyse et celle de la gonade mâle : apparition de cellules A.P.S positives et cyanophiles au 16e jour de gestation puis dégranulation de ces cellules indiquant une première décharge d'hormones gonadotropes dans la circulation peu avant la naissance.

Ces observations, confrontées avec celles de JOST et GONSE ( 1953 ) chez le Lapin, puis JOST et TAVERNIER ( 1956 ) chez le Rat, dénotent une évolution remarquablement parallèle de l'hypophyse embryonnaire chez ces différents Rongeurs.

D'autre part, l'action des hormones gonadotropes injectées in utero ( LINDH 1961 ) chez le Rat révèle une sensibilité maximum du testicule vers le 18e jour de gestation.

Dans le cas de la Souris, les dosages nous ont permis de déceler l'apparition d'un contenu en gonadotropes dans l'hypophyse entre le 16e et le 18e jour, précisément au moment où la différenciation morphologique et physiologique ( apparition de catécholamines primaires ) des noyaux hypothalamiques paraventriculaire et arqué s'est effectuée ( ENEMAR 1961, BJORKLUND et coll. 1968 et HYYPPA 1969 ).

L'étude in vitro nous a permis de constater que :

- 1) La gonade explantée aux stades indifférenciés était capable d'autodifférenciation non seulement morphologique, conformément aux résultats de WOLFF ( 1952 ) : formation de cordons en culture organotypique, mais aussi physiologique : apparition de l'activité enzymatique et de la fuchsinophilie mitochondriale des cellules interstitielles glandulaires.
- 2) Au cours des étapes suivantes de son développement, le testicule s'avère moins indépendant à l'égard des facteurs stimulateurs gonadotropes : la croissance du tissu de Leydig, l'intensité de son activité, la multiplication rapide des cellules germinales sont autant d'évènements qui n'ont pu être obtenus qu'avec un milieu de culture enrichi en gonadotropes.

Ceci confirme, étant donné l'absence d'activité hypophysaire décelable avant le 16e jour, l'hypothèse de l'existence in vivo d'une stimulation hormonale extra-embryonnaire ( RAYNAUD et FRILLEY 1947 et JOST 1950 ).

- 3) La gonade embryonnaire, assez peu sensible au 12e - 13e jour, à la présence d'hormones FSH et LH dans le milieu, se révèle, dès le 17e jour, capable de répondre de façon spectaculaire à la stimulation gonadotrope ( dilatation des cordons contenant de très nombreux gonocytes, envahissement des espaces interstitiels par des cellules de Leydig hypertrophiées, bourrées de grains fuchsinophiles et enzymatiquement hyperactives ). Précisons que si l'action de la LH se manifeste avant tout au niveau du tissu diastématique, comme c'est le cas chez l'adulte, la stimulation par la FSH porte en revanche sur les cellules glandulaires aussi bien que sur les cellules germinales ou les petites cellules épithéliales des cordons ( il est classiquement admis, chez l'animal impubère, qu'elle stimule spécifiquement le développement des tubes séminifères, LOSTROH 1969 ).

L'étude de la réponse des cellules interstitielles en fonction du temps montre que, prélevées au 18e jour, à l'époque où elles passent par un maximum de sensibilité, elles sont déjà significativement activées après 1 h 30 d'incubation en présence de gonadotropes et qu'après 12 h la stimulation obtenue est beaucoup plus forte encore ( cytoplasme surchargé de grains très fuchsinophiles, hyperactivité enzymatique  $\Delta^5 - 3\beta - \text{HSD}$  ).

Ces trois premiers points permettent de conclure que la gonade, au cours de son développement, passe par une période d'autonomie et de très faible sensibilité à l'égard des facteurs extérieurs gonadostimulateurs. Par la suite, elle semble simultanément acquérir une plus grande sensibilité à ces mêmes facteurs et perdre son indépendance à leur égard. On assiste, semble-t-il, au passage d'un contrôle avant tout génétique et intrinsèque du déroulement des étapes aboutissant à la différenciation testiculaire ( acquisition première de caractères cellulaires spécifiques ) à un contrôle hormonal extrinsèque. Ce contrôle pourrait intervenir en tant que facteur trophique spécifique permettant la croissance, l'acquisition de la masse tissulaire nécessaire à la survie de l'organe ( multiplication des cellules différenciées ). Rappelons à ce propos que dès 1961, HUSEBY et coll. ont souligné l'importance du rôle trophique des gonadotropes ( dilatations cytoplasmiques, mitoses ). Au niveau biochimique, les mécanismes permettant le passage progressif d'un état autonome à un état dépendant allant de paire avec l'acquisition d'une certaine réceptivité cellulaire semblent encore mal connus. Y a-t-il des séquences fondamentales par lesquelles la cellule en voie de différenciation doit passer successivement pour achever d'exprimer le programme de son génome ? L'acquisition d'une certaine sensibilité aux gonadotropes est-elle liée soit à l'apparition de protéines spécifiques ou de nucléotides jouant le rôle de médiateurs ou de vecteurs hormonaux, soit à la levée d'un inhibiteur intra- ou extra-cellulaire ? On sait en effet que chez l'adulte, les gonadotropes agissent sur la synthèse de progestérone à partir du cholestérol et que cette synthèse ne s'effectue que lorsque le cholestérol libre a pénétré dans les mitochondries. On sait, d'autre part, que si la progestérone formée n'est pas évacuée à l'extérieur de la membrane mitochondriale, non seulement elle ne peut être utilisée comme substrat de la  $\Delta^5-3\beta$  - H S D dans les microsomes, mais encore elle sert de frein à sa propre synthèse à partir du cholestérol.

4) L'hypophyse adulte en l'absence d'hypothalamus est capable d'exercer une action gonadotrope, ce qui confirme les résultats de PETROVIC ( 1961 et 1963 ) chez le Cobaye ou le Rat, montrant que la glande pituitaire est capable d'excrétion en culture organotypique et qu'elle conserve une certaine activité élaboratrice qualifiée de " fonctionnement de base " .

Au cours de son développement embryonnaire, l'hypophyse de Souris fait preuve également d'une certaine autonomie à l'égard des structures diencéphaliques.

5) L'incorporation de  $^{32}\text{P}$  par la gonade embryonnaire in vitro permet, d'une part, d'évaluer les effets de faibles quantités d'hormones gonadotropes contenues dans l'hypophyse foetale, d'autre part, de confirmer l'abaissement du seuil de sensibilité testiculaire aux gonadotropes après le 17<sup>e</sup> jour de gestation.

Nous avons pu mettre en évidence, grâce à cette technique, qui représente une adaptation in vitro du dosage de FLORSHEIM et coll. ( 1954 ), le rôle inhibiteur d'un extrait épiphysaire purifié sur la fonction gonadotrope en culture.

## II. Au cours du développement postnatal

La naissance étant un évènement fortuit au cours des processus évolutifs de la croissance du système endocrinien ( JOST 1961 ), nous avons été amenée à étudier certaines étapes du développement postnatal des testicules et de l'hypophyse.

Chez la Souris, dès la fin de la gestation, le tissu de Leydig entre dans une période de " mise en veilleuse " ( diminution de l'index mitotique, de l'activité globale enzymatique et mitochondriale, dissémination des îlots entre les cordons ). Au niveau hypophysaire, on observe simultanément une disparition presque totale des cellules A.P.S. positives synthétisant les hormones glycoprotidiques ( FSH, LH, TSH ). Cette période dure jusqu'au 6<sup>e</sup> jour post partum, âge à partir duquel les cellules A.P.S. positives réapparaissent nombreuses dans le parenchyme pituitaire. Ce phénomène de redémarrage de l'interstitielle n'apparaît qu'au cours de la 2<sup>e</sup> semaine. Le fait que les cellules hypophysaires Mc Manus positives passent par une période de repos chez l'embryon à terme rappelle les observations de JOST et TAVERNIER ( 1955 ) chez le Rat et de TIXIER - VIDAL ( 1958 ) chez le Poulet au moment de l'éclosion.

Chez une espèce voisine, le Rat, nous avons pu suivre le déroulement des mêmes étapes avec un retard chronologique de 3 - 4 jours, ce qui suggère une même interprétation de ces observations en faveur de l'interdépendance hypophyso - gonadique.

L'existence, chez le Rat comme chez la Souris, d'interactions hypothalamo - hypophyso - gonadiques précédant l'âge critique de " différenciation sexuelle diencephalique " ( 6<sup>e</sup> jour ) est d'autre part suggérée par

1) la précocité de l'hypertrophie compensatrice testiculaire après hémicastration à la naissance : dès le 4<sup>e</sup> jour, on constate ainsi les effets de la diminution du "feed - back" androgénique au niveau diencephalique;

2) la précocité de l'hypertrophie hypophysaire ( 5e jour ) après castration totale à la naissance.

Chez le Rat, le rôle modulateur de l'épiphyse ( MOSZKOWSKA et EBELS 1970 ) dans les interactions neuroendocriniennes a été mis en évidence. Au cours de la première semaine post partum, nous avons constaté qu'il se produisait un développement exceptionnel de cette glande: 200 % d'augmentation pondérale entre le 5e et le 7e jour, par la suite sa croissance est extrêmement lente ( 50 % entre le 10e et le 40e jour ); cette période correspond à celle de l'apparition d'un taux d'amines biogènes ( sérotonine ) histochimiquement décelable dans le parenchyme épiphysaire.

Des techniques plus sensibles permettront peut - être de déceler, dès la fin de la vie embryonnaire, l'existence de contrôles monoaminergiques neuroglandulaires. L'intervention précoce de ces contrôles est susceptible de contribuer à la préparation du climat hormonal ( FSH, LH, androgènes ) nécessaires au déroulement normal du développement testiculaire.



LES PLANCHES SUIVANTES ILLUSTRONT NOTRE  
ETUDE CHEZ LA SOURIS.

---





## Pl a n c h e I

Evolution de la gonade mâle depuis sa différenciation jusqu'au 19e jour  
ante partum.

Fixation : Helly. Coloration : Masson modifié par Benoit et Statbli.

Grossissement : 480.

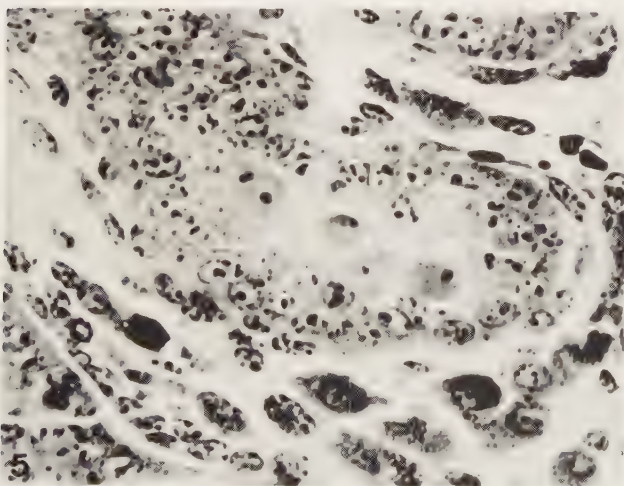
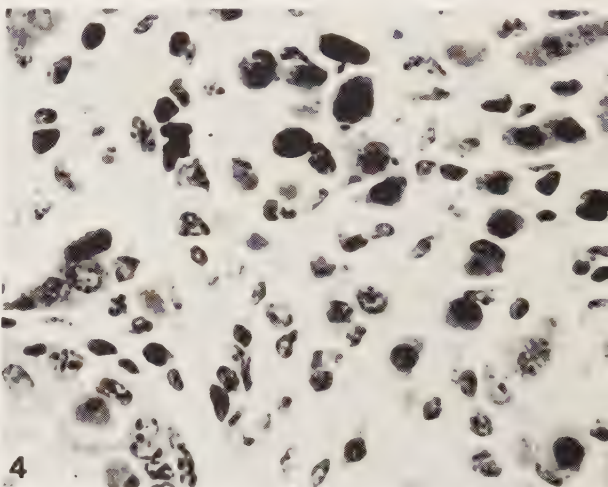
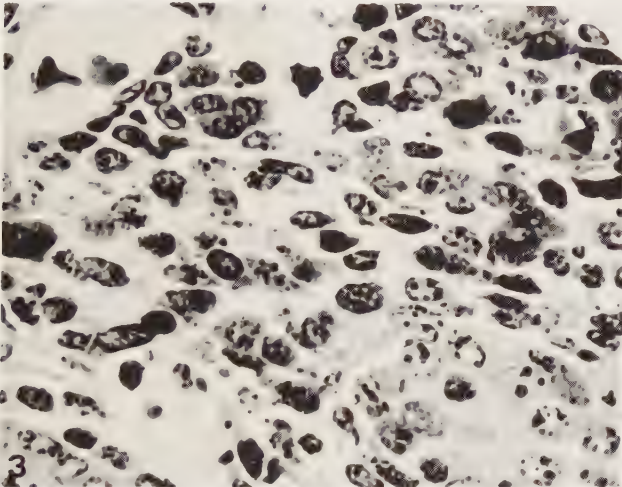
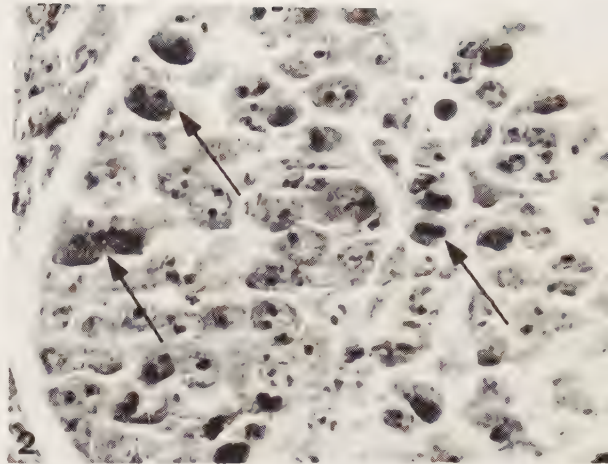
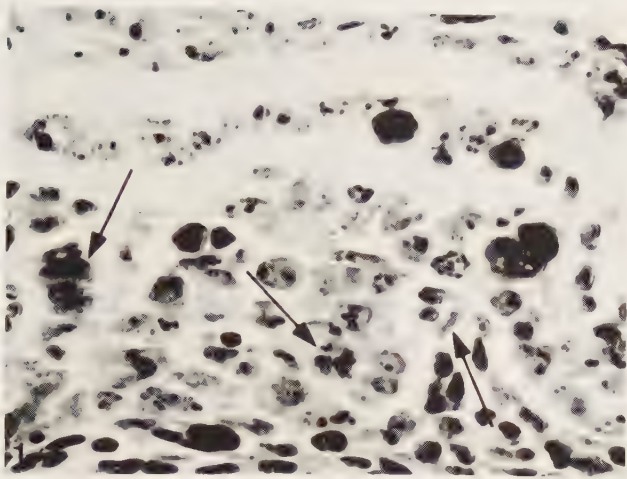
fig 1. - Testicule de 12  $\frac{1}{2}$  jours. Infiltration du mésenchyme ( flèche de droite ) dans l'épithélium germinatif où de nombreuses cellules germinales sont en cinèse ( flèche du centre et flèche de gauche ). Pas de réaction fuchsinophile du chondriome.

fig 2. - 13e jour de gestation. Ebauche des premiers cordons. Réaction fuchsinophile dans les espaces interstitiels et dans certaines cellules en bordure des cordons ( flèche de droite ). Les premières cellules de Leydig se divisent activement ( flèche de gauche ).

fig 3 et 4. - Le testicule au 14e et 16e jour de la vie foetale comporte d'importantes plages de tissu interstitiel très actif ( cellules à cytoplasme bourré de granules très fuchsinophiles ). Les cellules fuchsinophiles ont disparu des cordons.

fig 5. - Testicule au 18e jour. Tissu interstitiel très actif.

fig 6. - 19e jour de gestation. Les cellules de Leydig se distribuent en travées interstitielles. Avec la croissance du testicule apparaissent de grands espaces vides entre les cordons. Dans le cytoplasme des cellules de Leydig apparaissent des vacuoles lipidiques. ( flèches ).







## Pl a n c h e II

### Evolution de la gonade mâle de la naissance au 7e jour post partum.

Même fixation et coloration que pour la planche I.

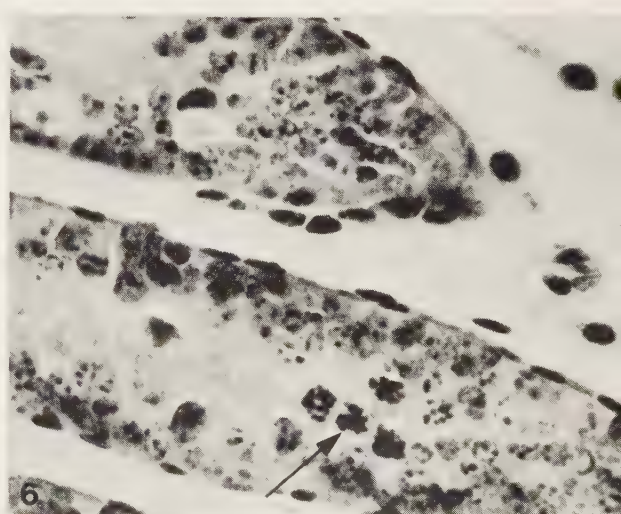
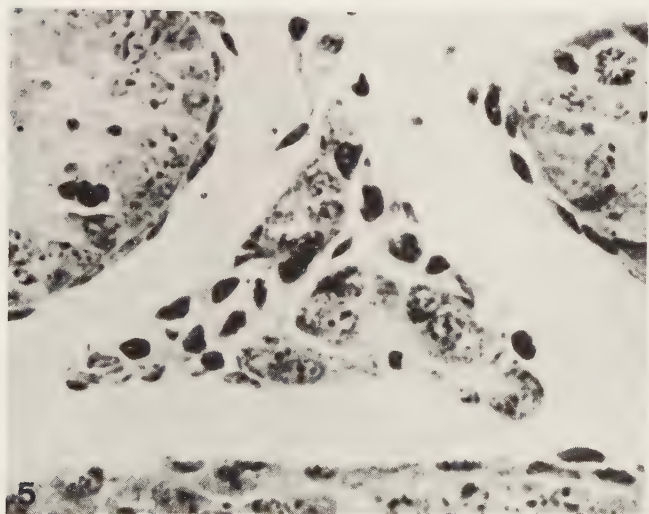
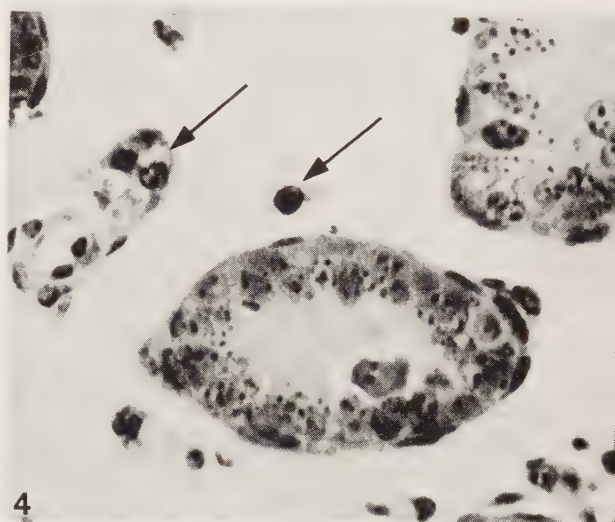
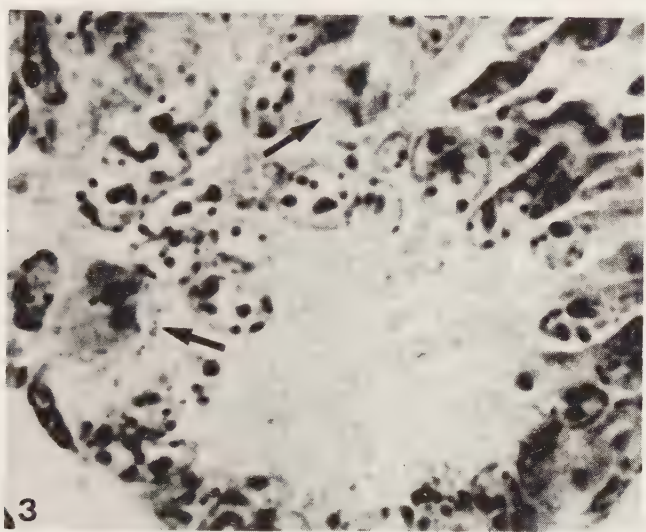
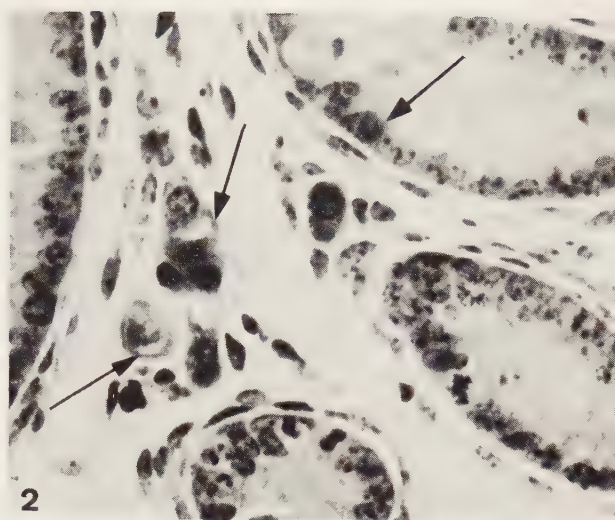
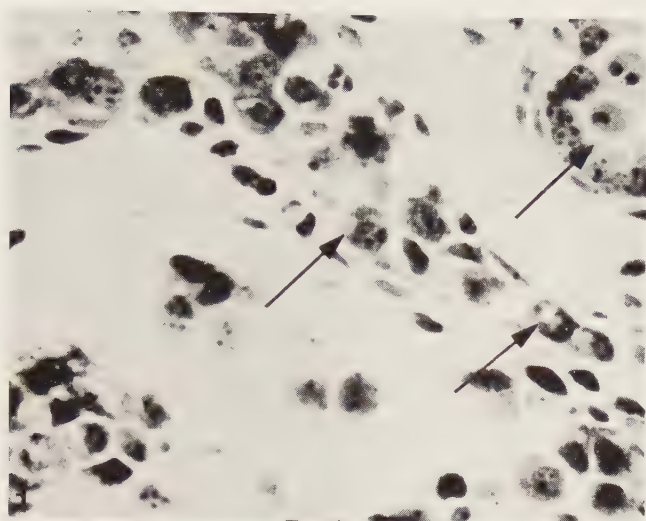
fig 1 et 2. - Testicule à la naissance. Même distribution en travée qu'en fin de gestation. Le cytoplasme des cellules de Leydig renferme de nombreuses vacuoles lipidiques voisinant avec les grains fuchsinophiles ( flèche du centre ). Les cellules germinales migrent vers la périphérie des cordons; leur noyau est parfois entouré d'un halo clair ( flèche en haut à droite ). Dans le cordon ( en haut de la fig 2 ), apparaît une des premières gonies A.  
Grossissement : 480.

fig 3. - Testicule au 5e jour post partum. Migration des cellules germinales vers la périphérie des tubes où elles sont encerclées par les cellules somatiques ( flèches ). Le centre des tubes apparaît complètement vidé de cellules germinales.  
Grossissement 1200.

fig 4. - Testicule au 5e jour. Aspect quiescent de certains flots interstitiels ( flèche de gauche ). Inclusion lipidique "perlée" dans une cellule de Leydig ( flèche de droite. En bas : un gonocyte en dégénérescence. Grossissement 480.

fig 5. - 7e jour. Le cytoplasme des cellules de Leydig reste riche en inclusions lipidiques mais pauvre en granules fuchsinophiles. Remarquer les noyaux pycnotiques dans l'îlot. Grossissement 480.

fig 6. - 7e jour. Croissance très importante des tubes; croissance relativement réduite de l'interstitielle. Première méioses ( flèche ).  
Grossissement 480.







### P l a n c h e   III

#### Evolution de la gonade mâle du 11e jour post partum au 31e jour.

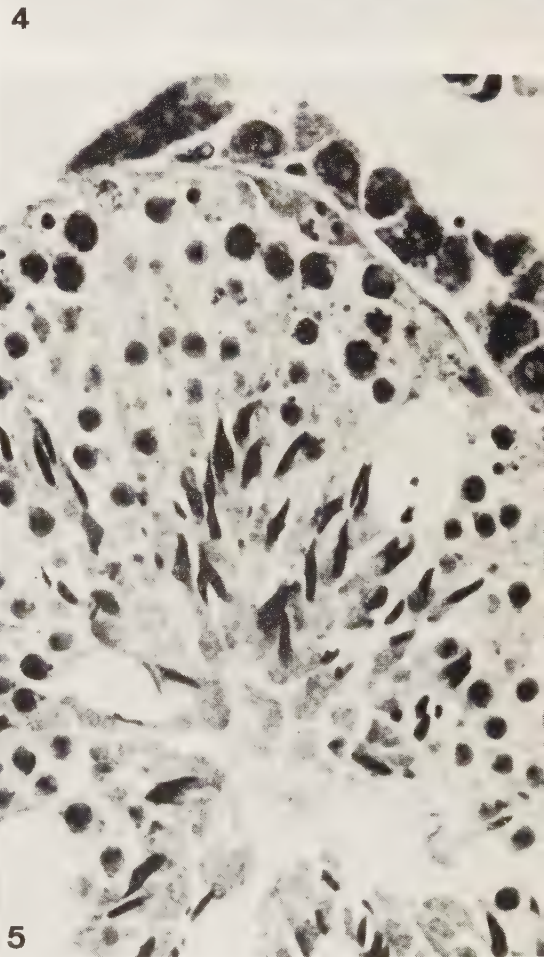
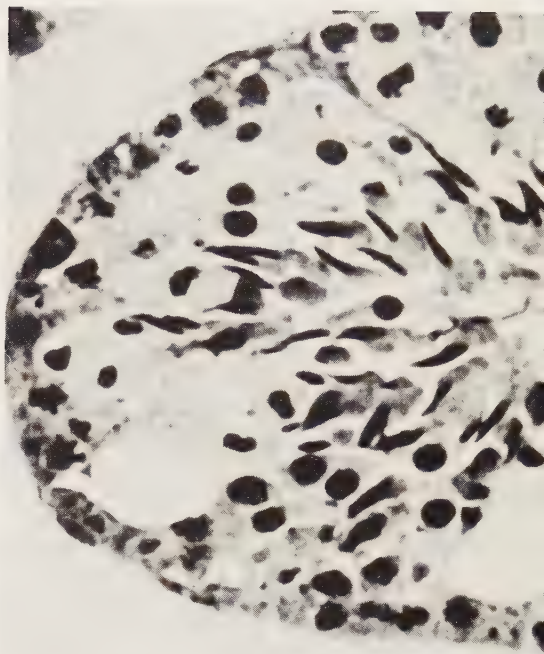
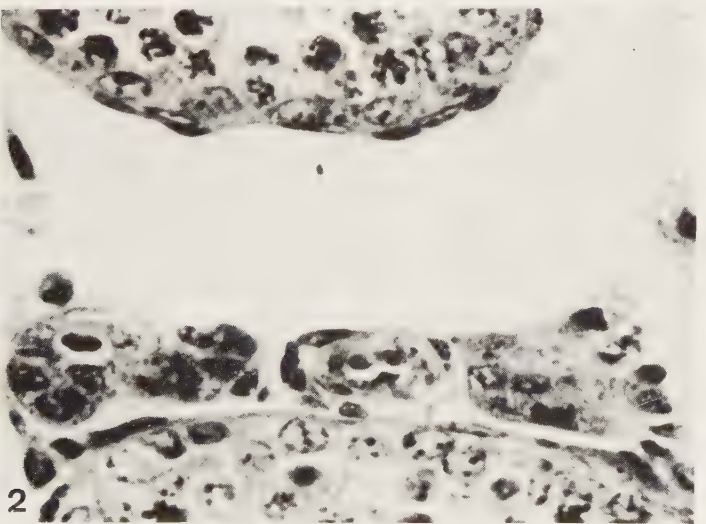
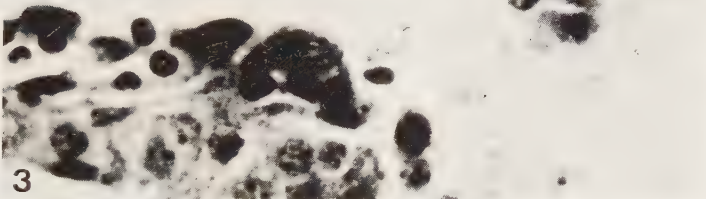
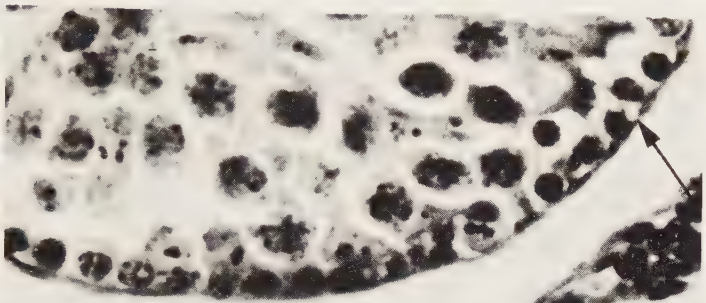
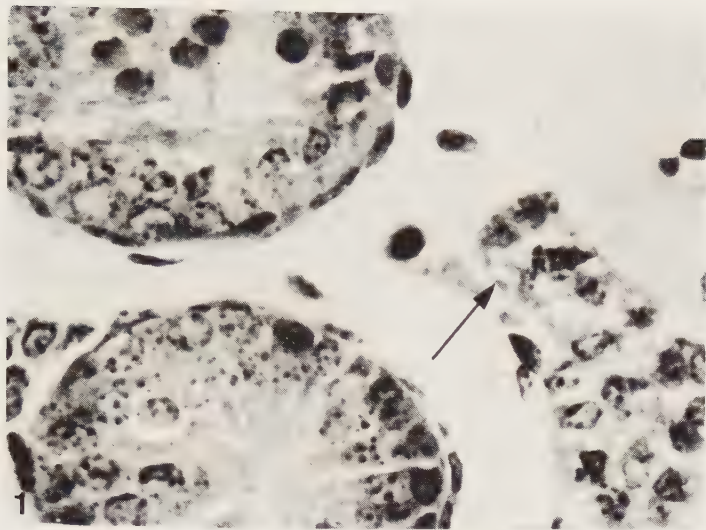
Même fixation, coloration et grossissement que pour les planches précédentes.

fig 1. - Testicule de 11 jours. Peu d'évolution par rapport au testicule de 7 jours mais moins de figures pycnotiques dans les plages de tissu interstitiel : premiers signes d'une reprise d'activité. Les vacuoles lipidiques restent nombreuses ( flèche ) .

fig 2. - Testicule de 25 jours. Les cellules interstitielles ont repris une apparence très active; les îlots sont plus nombreux et de plus grande dimension. Début de formation de la "dentelle lacunaire" dans les tubes ( flèche ).

fig 3. - Testicule de 17 jours. Le cytoplasme des cellules de Leydig se dilate et se charge en grains fuchsinophiles.

fig 4 et 5. - Testicule de 31 - 34 jours. Spermiogénèse complète. Nombreuses lacunes de dégénérescence dans l'épithélium germinatif. Plaque de cellules de Leydig très actives.







P l a n c h e IV

Apparition de la réaction de la  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D ( D H A ) dans le testicule foetal de Souris.

Obj. X 10

fig 1. - Coupe témoin de gonade de 12 jours incubée sans stéroïde.

fig 2. - Réaction fine et dispersée de la  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D dans le noyau épithélial à 12 jours ante partum.

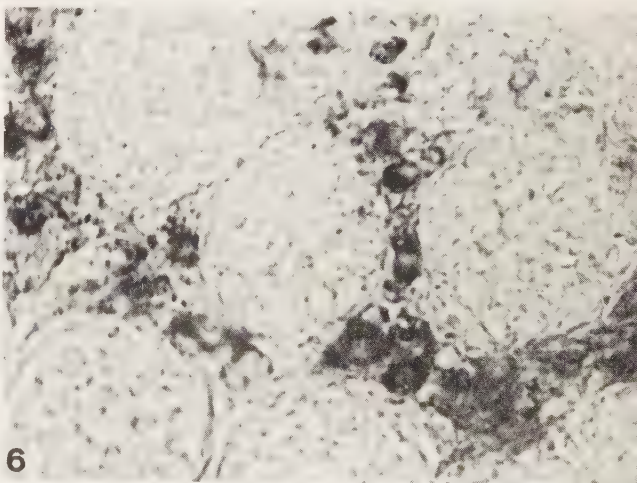
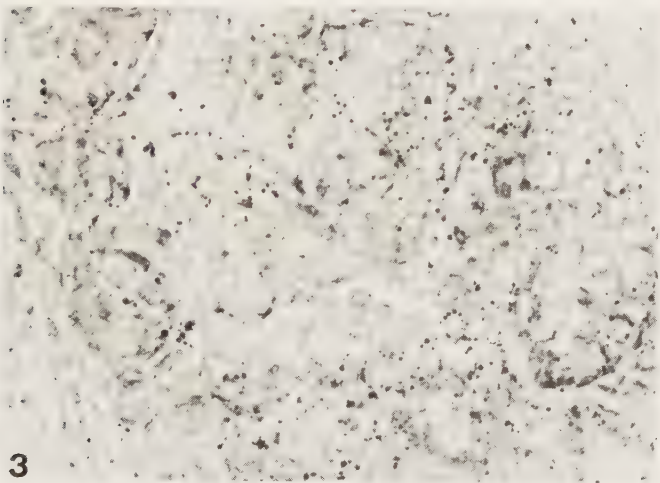
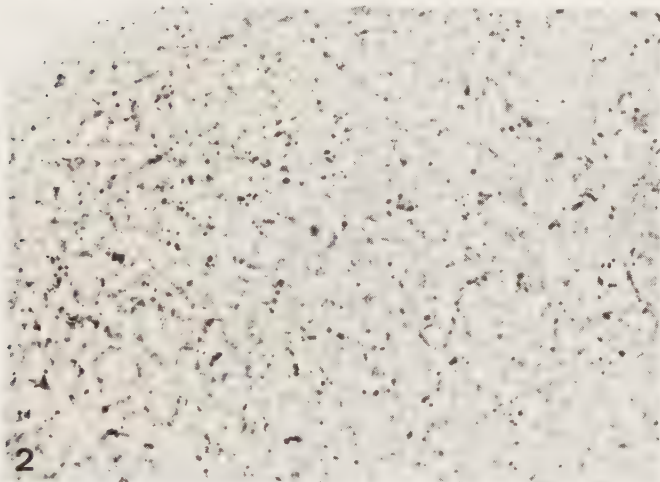
fig 3. - Réaction au moment de la formation des cordons testiculaires à 12 1/2 jours.

fig 4. - Réaction dans les cellules interstitielles se différenciant entre les cordons à 13 jours.

fig 5. - Réaction à 14 jours

fig 6. - Obj. immersion. Détail de la réaction à 14 jours.

Remarquer l'évolution très rapide de la réaction entre 12 1/2 jours ( fig 3 ) et 14 jours ( fig 5 et 6 ).







P l a n c h e   V

Evolution de la réaction de la  $\Delta^5-3\beta$  - H S D ( D H A ) dans le testicule  
avant et après la naissance.

Obj. X 10.

fig 1. - Pas de réaction non spécifique dans les cellules interstitielles  
du testicule témoin incubé sans stéroïde.

fig 2. - Réaction intense dans les cellules interstitielles au 18e  
jour ante partum.

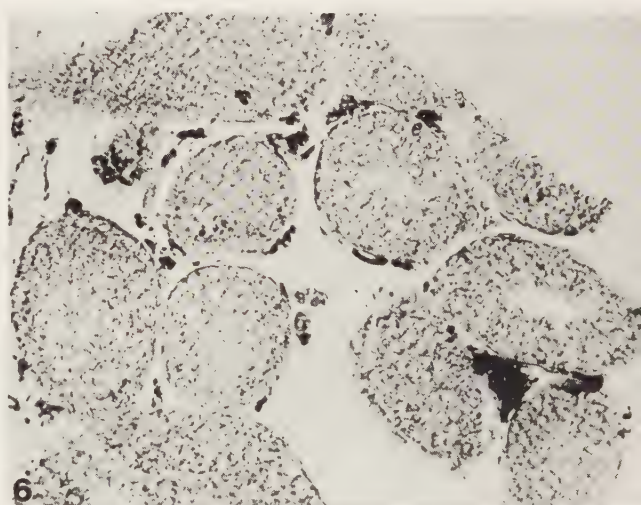
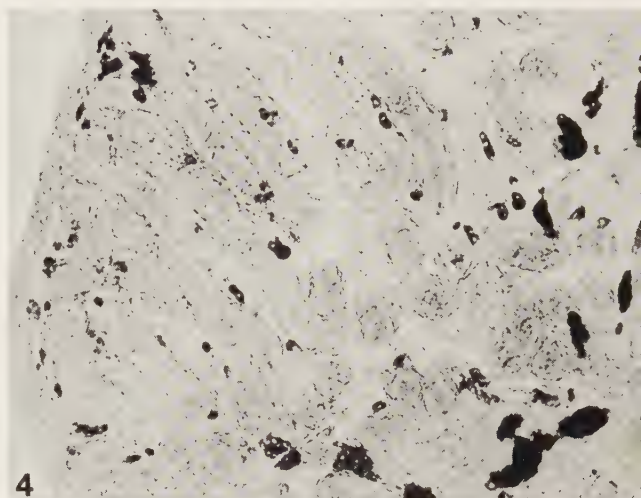
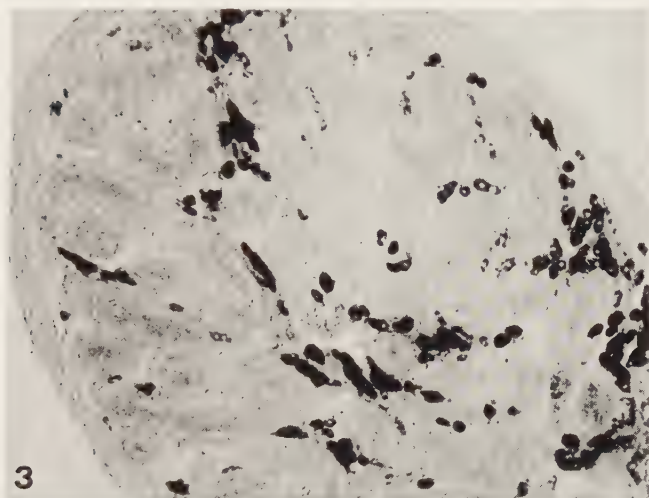
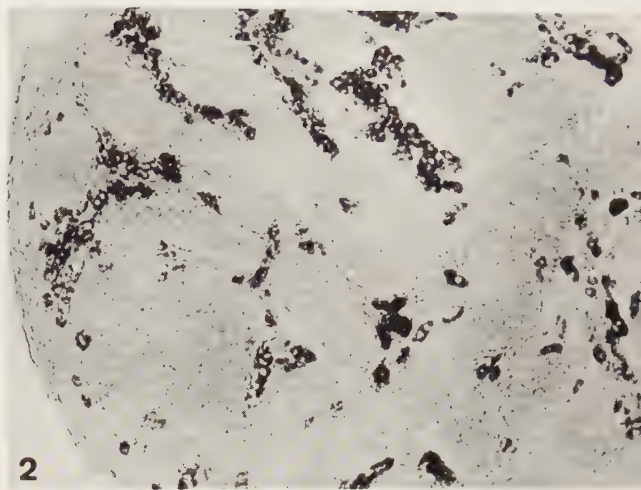
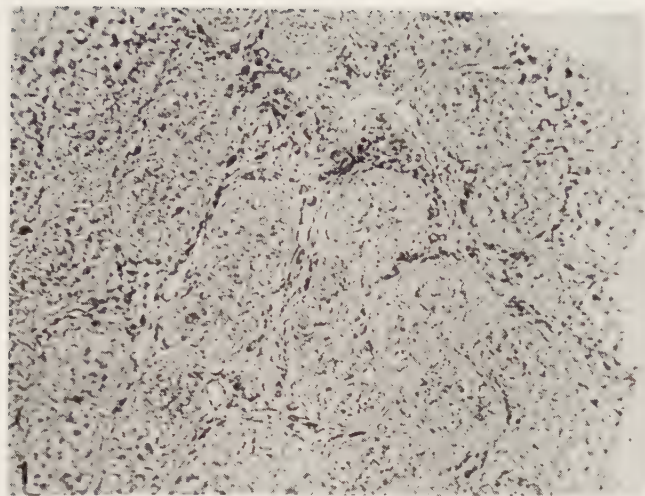
fig 3. - Idem à la naissance.

fig 4. - Dispersion des îlots et affaiblissement relatif de la réaction  
entre les tubes séminifères en prolifération au 4e jour post  
partum

fig 5. - Idem au 6e jour post partum

fig 6. - Idem au 14e jour post partum.

Remarquer la croissance importante des cordons puis des tubes  
après la naissance, allant de pair avec la dispersion des îlots  
de cellules de Leydig réactives dans les espaces interstitiels.







P l a n c h e   V b i s

Mise en évidence des lipides osmiophiles dans les cellules interstitielles  
du jeune testicule de Souris.

Coupes semi - fines (  $1.5 \mu$  ) de testicules fixés à l'acide osmique et inclus  
à l ' Epon 812, contrastées à la p-phénylènediamine.

Obj. X 40.

fig 1. - 14e jour ante partum. Entre les cordons, les cellules intersti-  
tielles se distinguent par leur cytoplasme dense ( réticulum  
lisse) et granuleux ( mitochondries ), contenant quelques inclu-  
sions lipidiques osmiophiles ( flèche ).

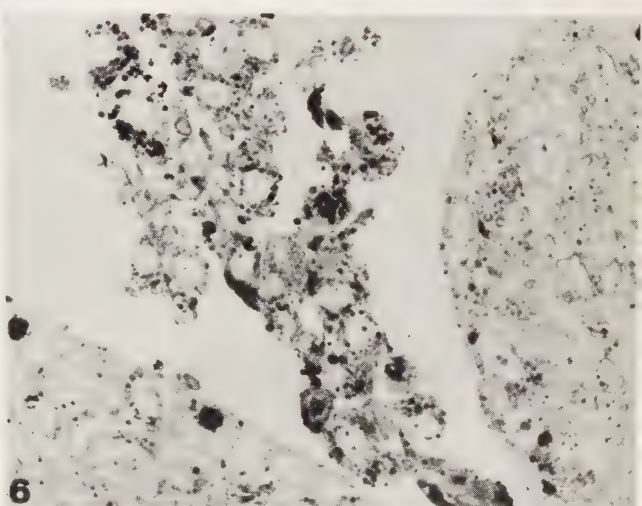
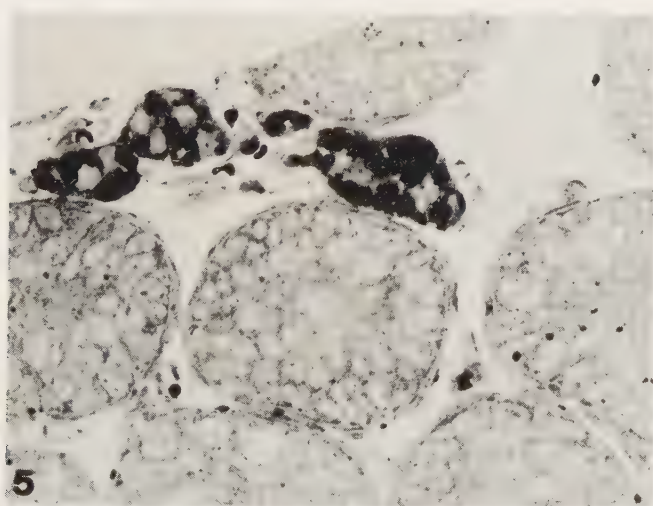
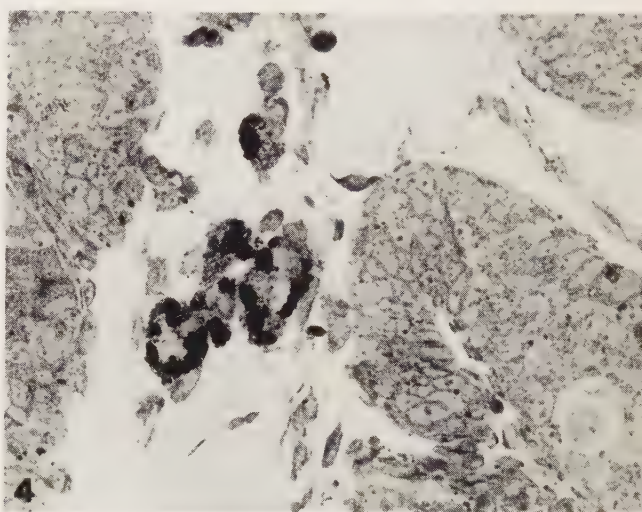
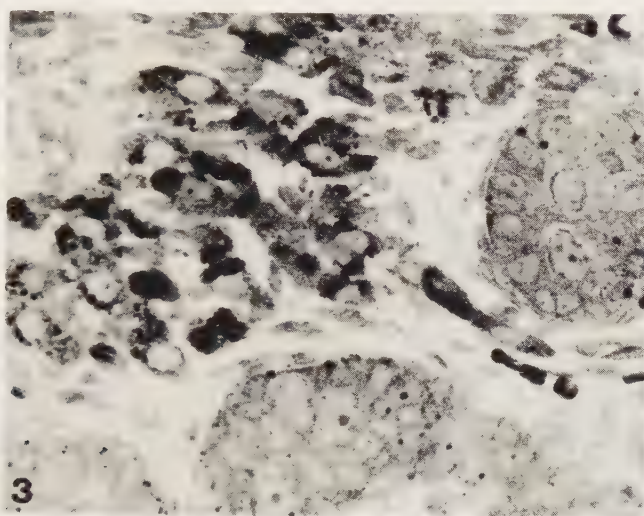
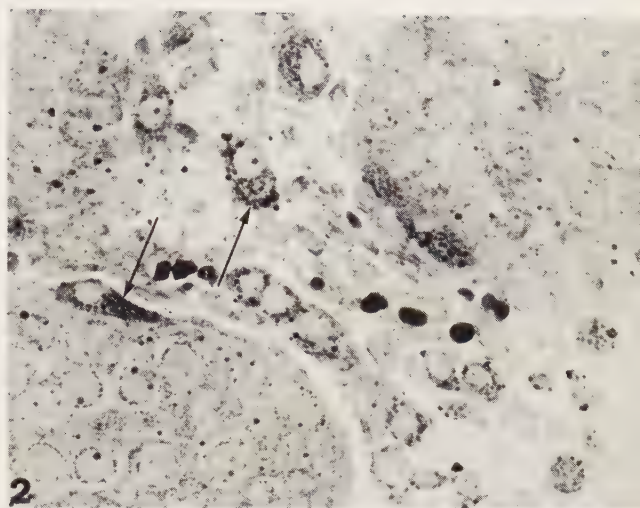
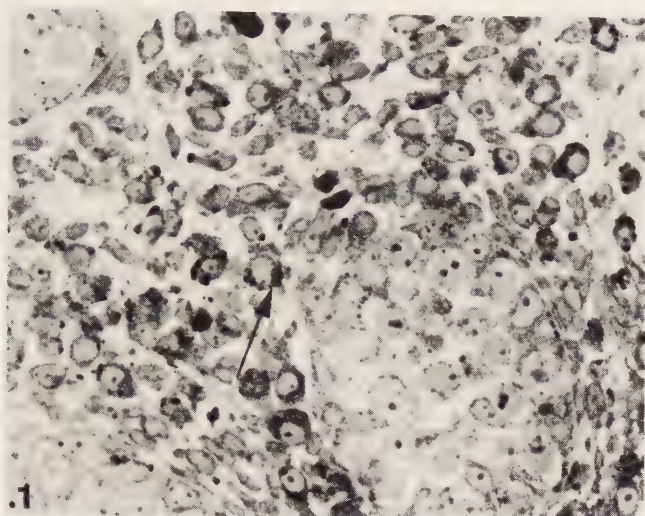
fig 2. - 17e jour ante partum. Nombreux grains lipidiques dans les cellules  
de Leydig ( flèche de droite ); certaines sont en position tangentielle  
par rapport aux cordons ( flèche de gauche ).

fig 3. - Testicule à la naissance. Osmiophilie très intense dans les  
espaces interstitiels .

fig 4. - 4 jours post partum. Les îlots interstitiels très osmiophiles  
apparaissent disséminés entre les cordons dont la croissance est  
très importante .

fig 5. - 14 jours post partum. Globules lipidiques fortement osmiophiles  
dans certains îlots.

fig 6. - Testicule de 40 jours; en pleine activité sécrétrice, les cellu-  
les de Leydig sont moins chargées de vacuoles lipidiques.







## Pl a n c h e VI

### Apparition et évolution de la réaction A. P. S. dans l'hypophyse "in vivo"

Fixation : Bouin - Hollande sublimé. Coloration : A. P. S. hémalum.

Grossissement : 1200

fig 1. - Pars distalis au 13e jour de gestation. Pas de réaction A. P. S. positive, nombreuses cinèses. La flèche indique une cellule en prophase.

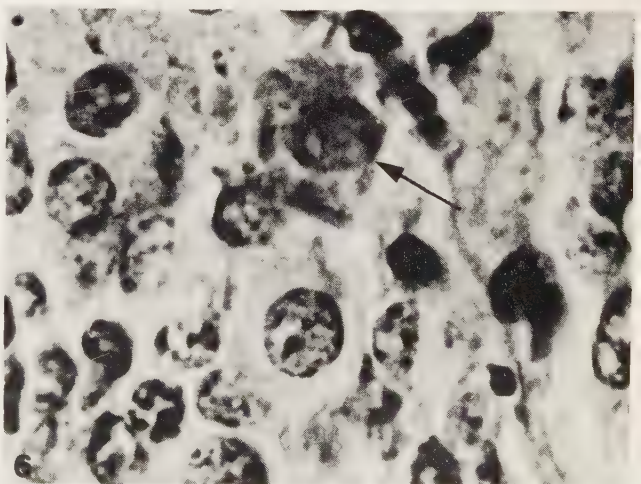
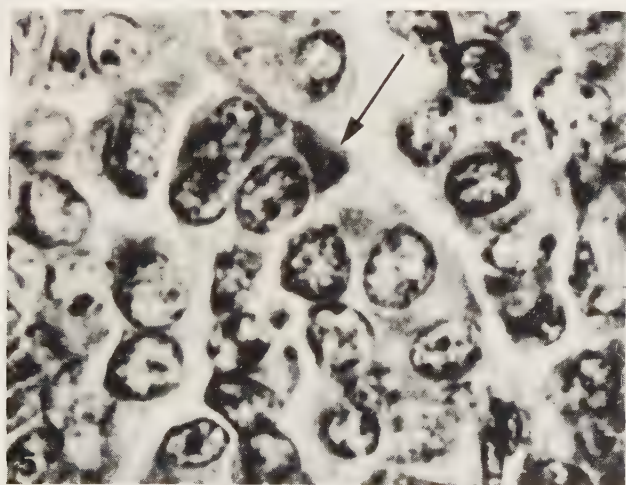
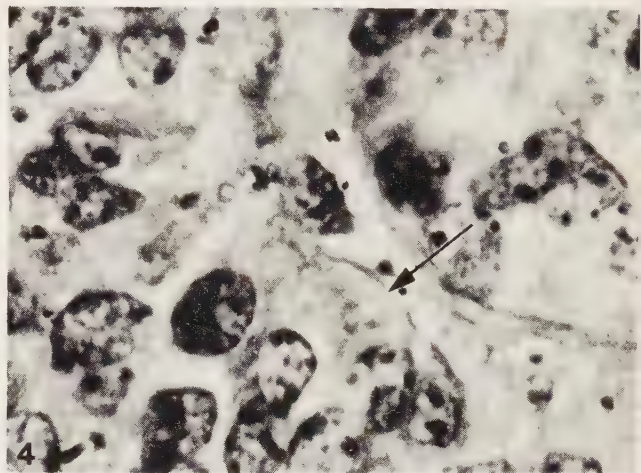
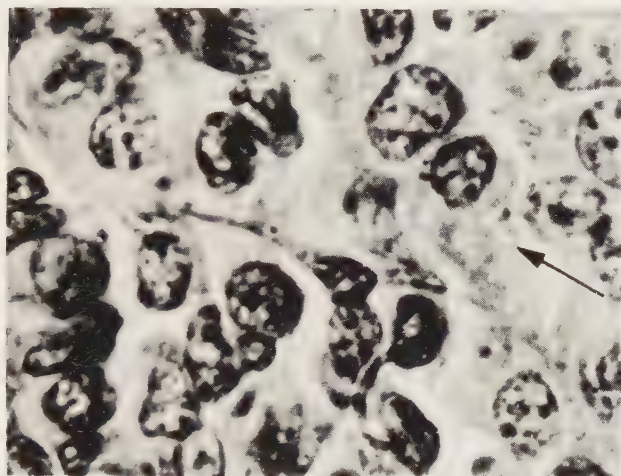
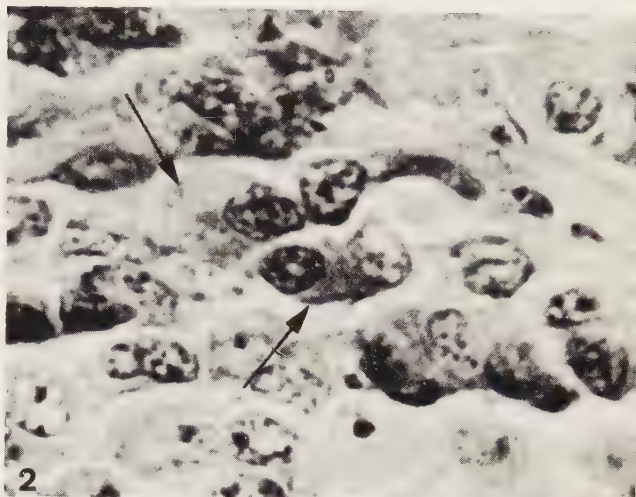
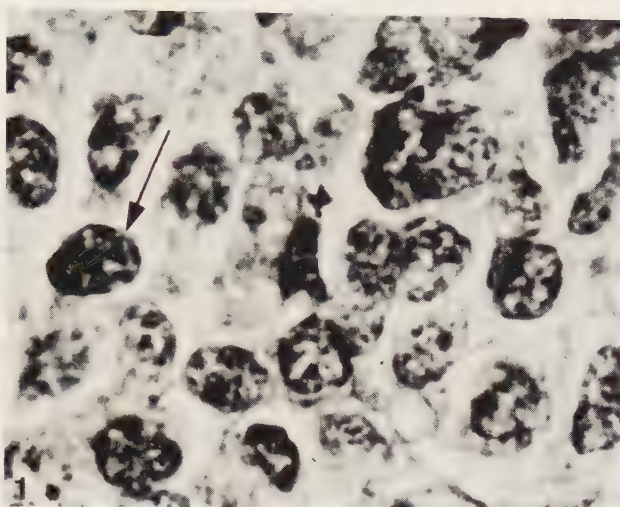
fig 2. - 15e - 16e jour. Apparition des premières cellules A. P. S. positives ( flèches ).

fig 3. - 18e - 19e jour. Diminution du nombre des cellules A. P. S. positives. Le cytoplasme des cellules à FSH apparaît gonflé, dégranulé et A. P. S. négatif ( flèche ).

fig 4. - Hypophyse à la naissance; aspect peu différent; les cellules gonadotropes en bordure du vaisseau ne se sont pas rechargées en granulations A. P. S. positives ( flèche ).

fig 5. - 3e jour post partum. Très rares cellules A. P. S. positives ( flèche ).

fig 6. - 6e jour post partum. Réapparition de nombreuses cellules A. P. S. positives de type gonadotrope FSH ( flèche ) et LH.







## Pl a n c h e VII

### Evolution de la réaction A. P. S. dans l'hypophyse post partum.

Même fixation, coloration et grossissement que pour la planche précédente.

fig 1. - Hypophyse de Souris au 6e jour, date de la réapparition de la réaction dans les cellules " basophiles ". Cinèse.

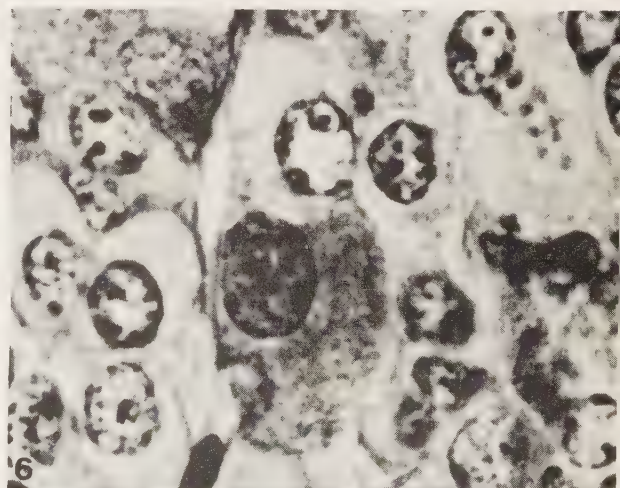
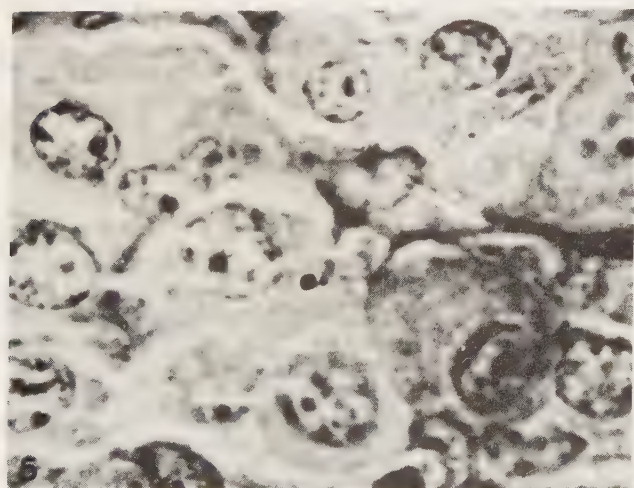
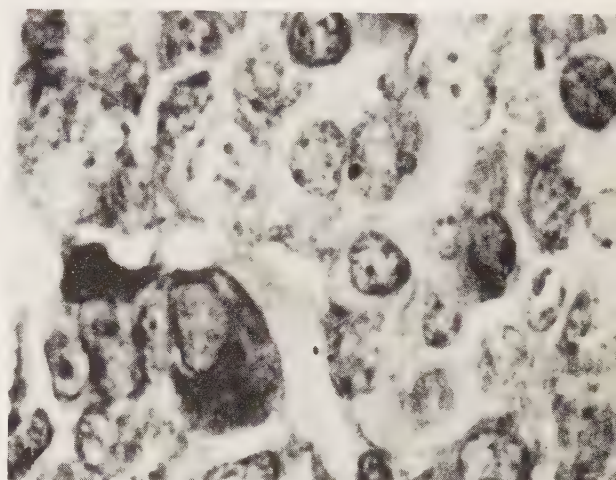
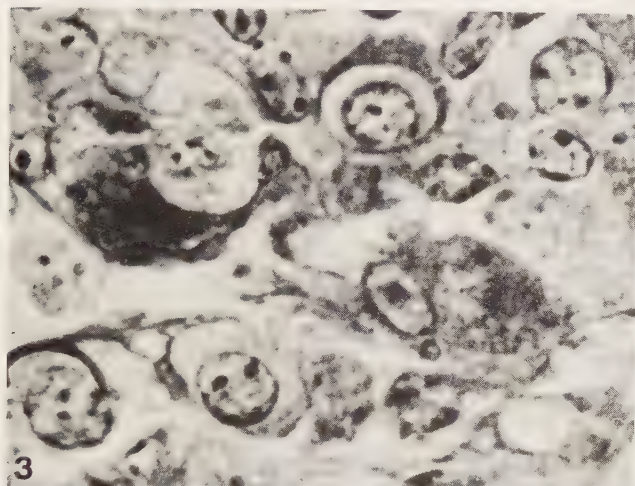
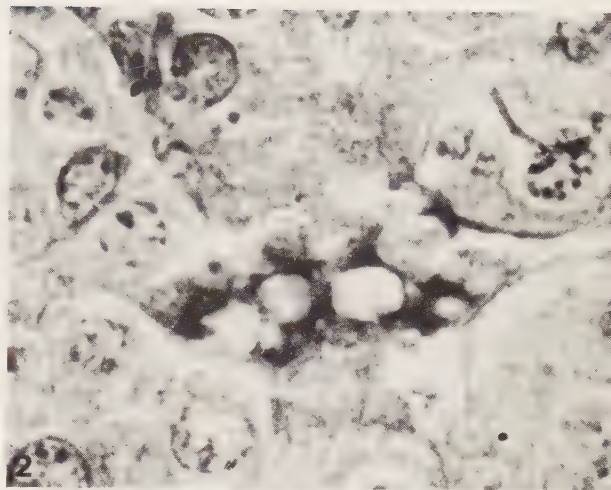
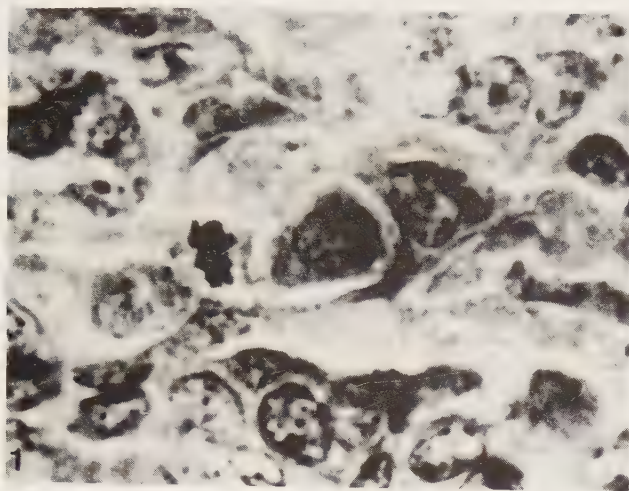
fig 2. - 9e jour; entre les cellules de type gonadotrope dégranulées, A. P. S. négatives, apparaissent des flaques de sécrétion Mc Manus positives.

fig 3. - Même stade; deux grosses cellules de type FSH; en haut une cellule ronde de type LH.

fig 4. - 17e jour. Les cellules gonadotropes en bordure des vaisseaux apparaissent soit en phase de stockage fortement A. P. S. positives, soit en phase de décharge ( cytoplasme gonflé mais clair ).

fig 5. - 25e jour. Même aspect général; la taille des gonadotropes a encore augmenté.

fig 6. - 34e jour. Hypophyse de l'animal pubère.







## Pl a n c h e VIII

### Evolution de la réaction A. P. S. de la naissance à la puberté.

Même fixation et coloration que pour la planche précédente.

Grossissement : X 480.

fig 1. - Hypophyse du nouveau - né.. Les cellules du type gonadotrope en bordure des vaisseaux ont le même aspect cytoplasmique dégranulé A. P. S. négatif qu'à la fin de la vie ante partum ( flèches ). Comparer avec le détail représenté sur la fig 4 planche VI.

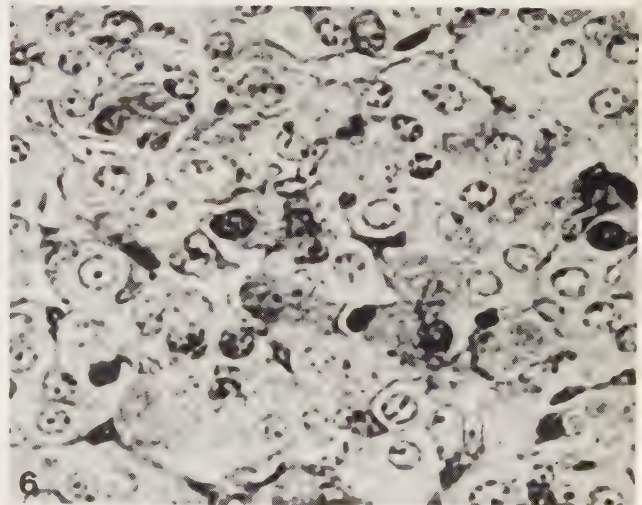
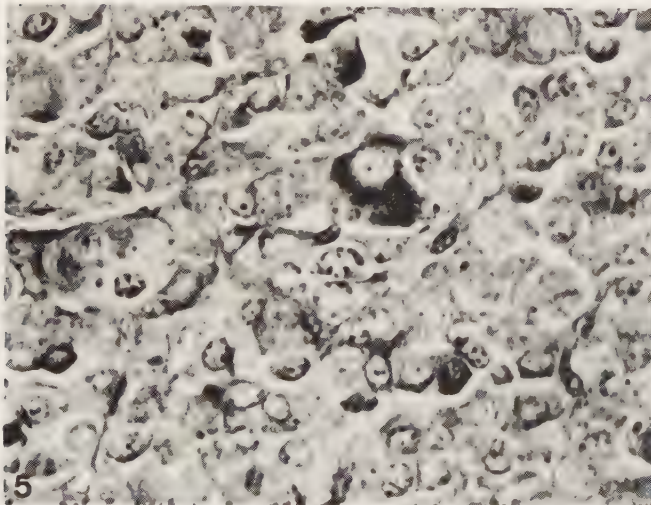
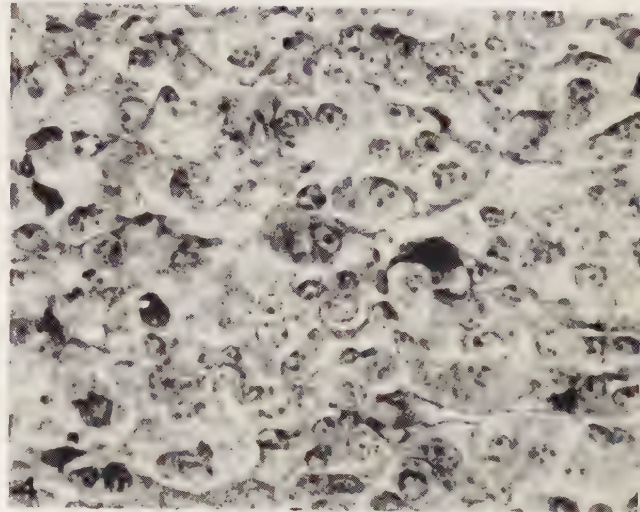
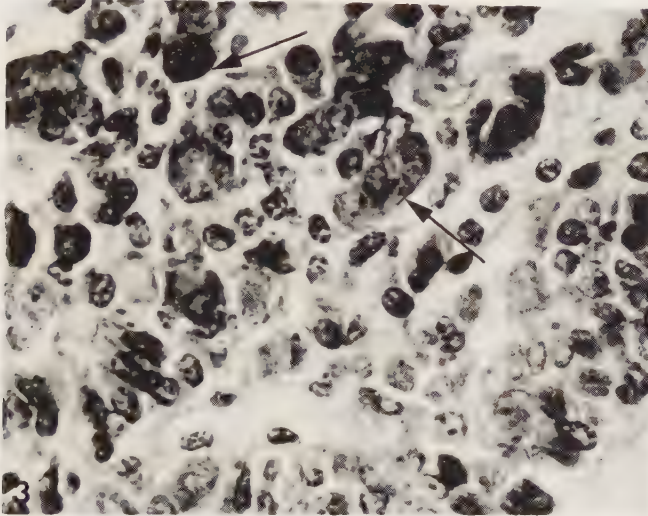
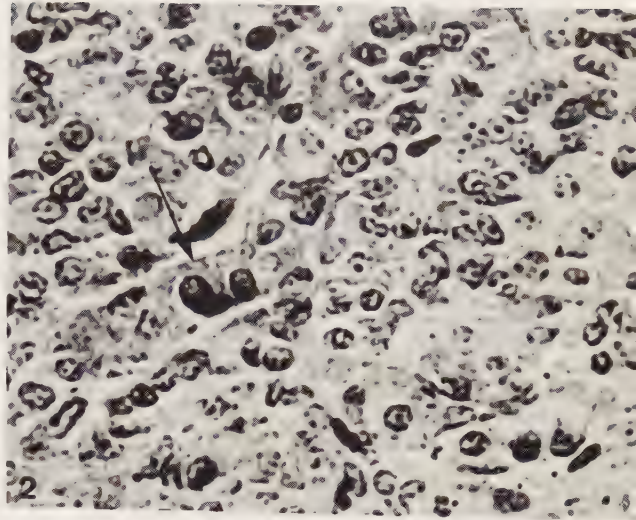
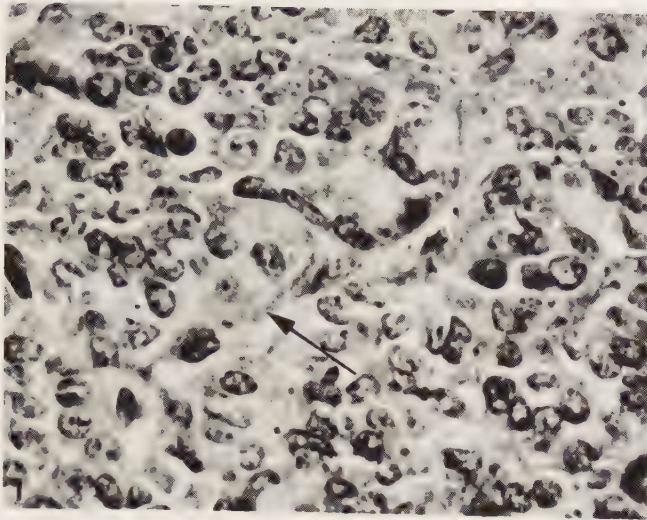
fig 2. - A l'âge de 6 jours : la réaction A. P. S. réapparaît ( flèche ); voir détail planche VI fig 6.

fig 3. - 8e jour. Plage de cellules fortement A. P. S. positives ( flèches ).

fig 4. - 9e jour. Les cellules gonadotropes au bord des vaisseaux apparaissent soit A. P. S. positives, soit dégranulées en phase d'excrétion.

fig 5. - 17e jour. Les cellules A. P. S. positives ne semblent pas, dans l'ensemble, plus nombreuses; par contre elles augmentent de taille.

fig 6. - 34e jour. Vue d'ensemble d'une zone gonadotrope .Comparer avec le détail planche VII fig 6.







P l a n c h e IX

Culture "in vitro" du testicule de Souris embryonnaire ( fin de gestation ).

Temps en culture : 60 heures. Grossissement : 480 .

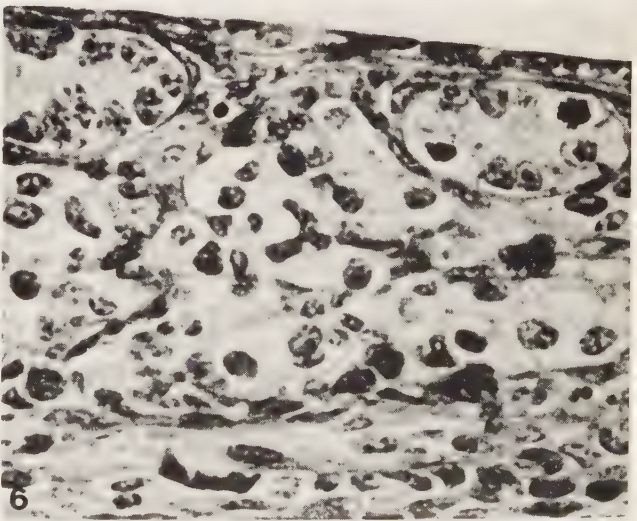
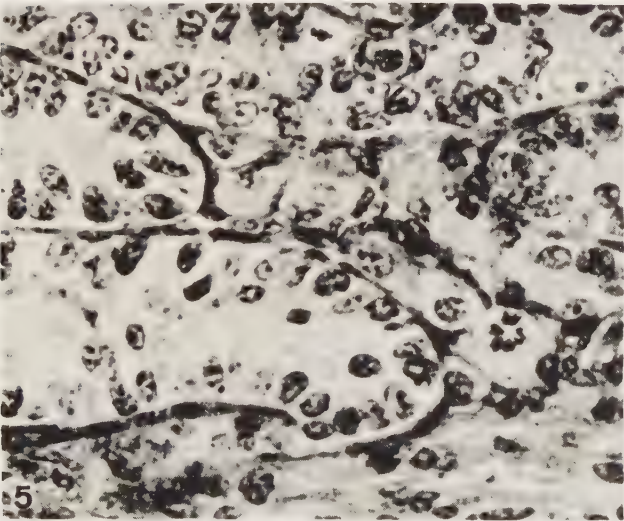
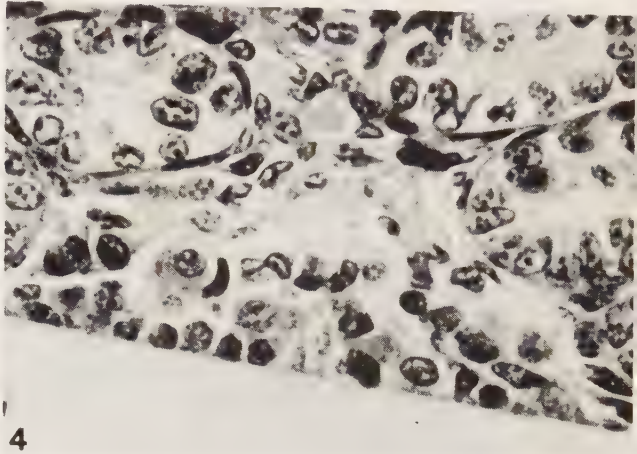
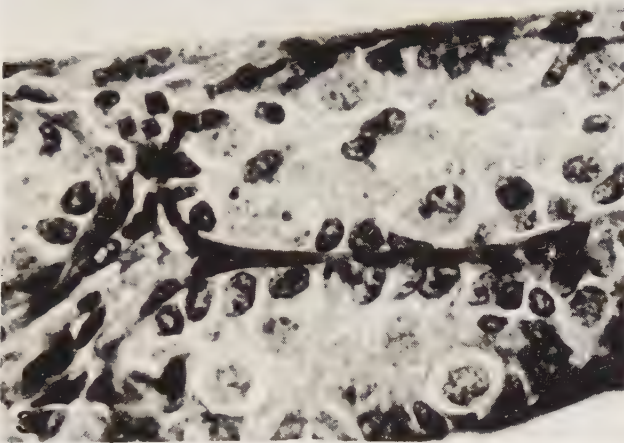
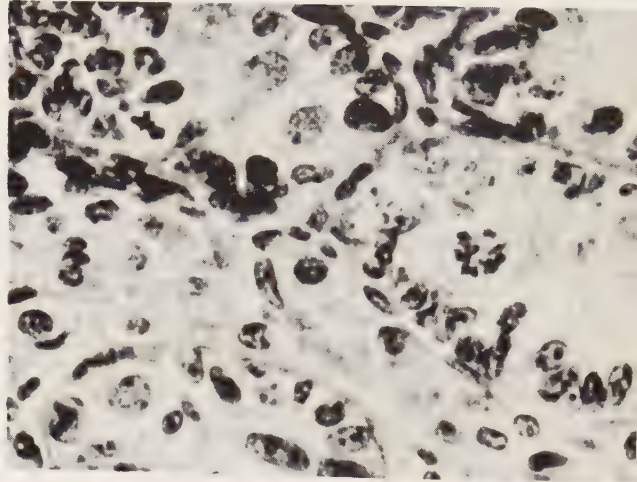
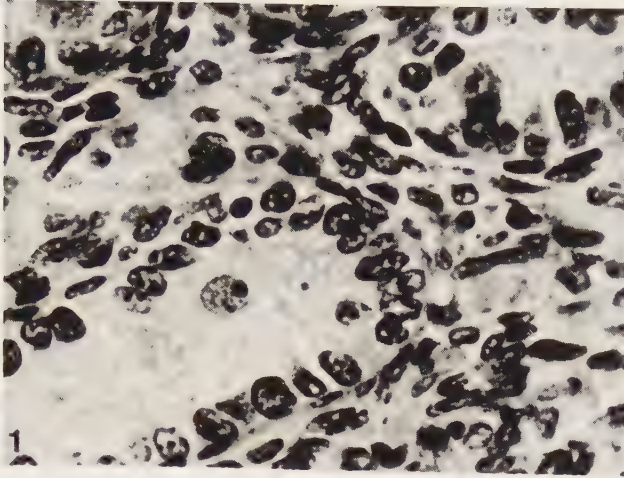
fig 1. - Testicule cultivé seul; les cellules de lignée sertolienne sont moins denses au pourtour des cordons et le cytoplasme des cellules de Leydig est moins dilaté qu ' in vivo ( comparer fig 6 planche I et fig 2 planche II ).

fig 2. - Testicule cultivé en présence de FSH et de LH purifiées (  $4\mu\text{g}$  +  $2\mu\text{g}$  ). Hyperplasie des cellules interstitielles; cinèse goniale.

fig 3. - Testicule cultivé en présence de FSH seule (  $8\mu\text{g}$  ).  
Noter le développement des cordons par rapport à l'évolution in vivo ( planche II fig 2 ).

fig 4. - Testicule cultivé en présence d'hypophyse embryonnaire ( fin de gestation). Le cytoplasme des cellules interstitielles apparaît légèrement dilaté par rapport au témoin ( fig 1 ); la fuchsinophilie du chondriome est plus évidente.

fig 5 et 6. - Testicule cultivé en présence d'hypophyse adulte. Hyperplasie interstitielle; cinèses. La figure 5 représente le plus petit îlot de la culture.



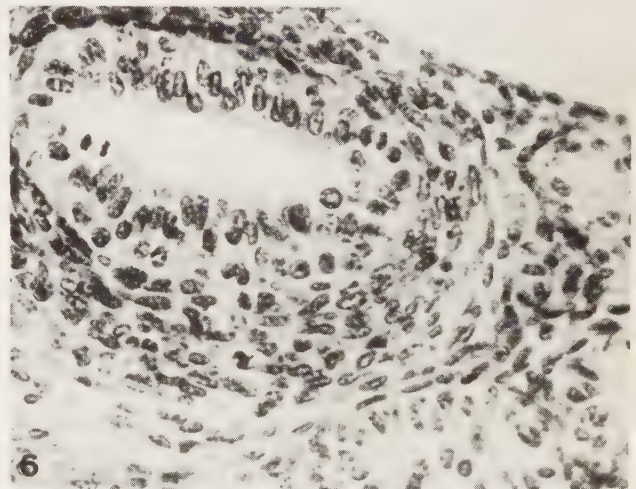
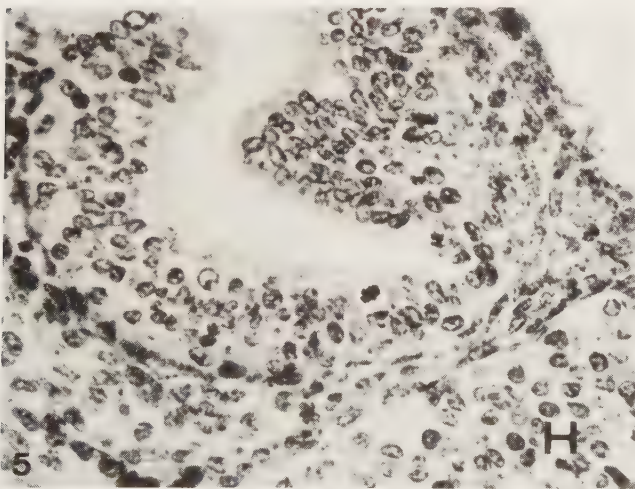
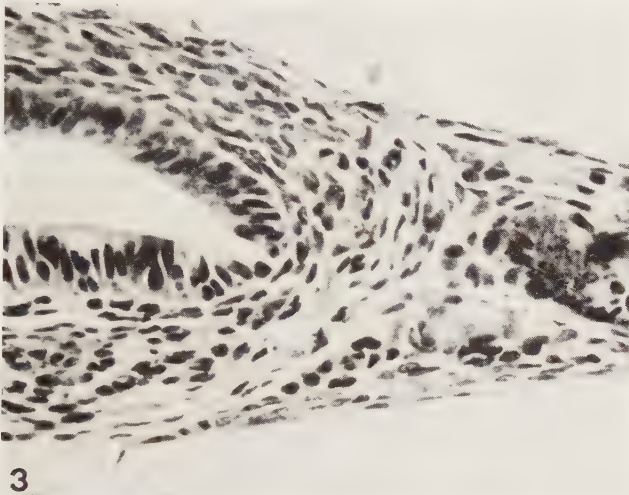
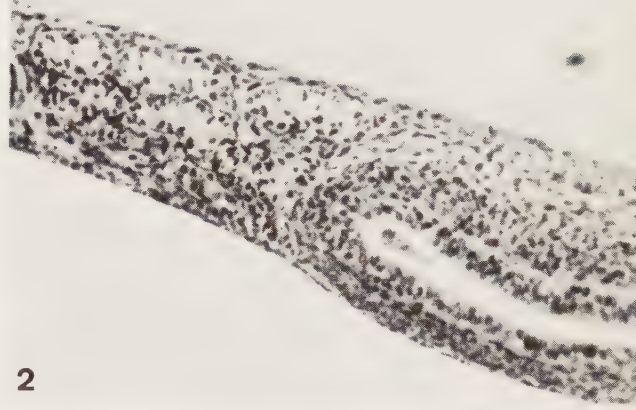
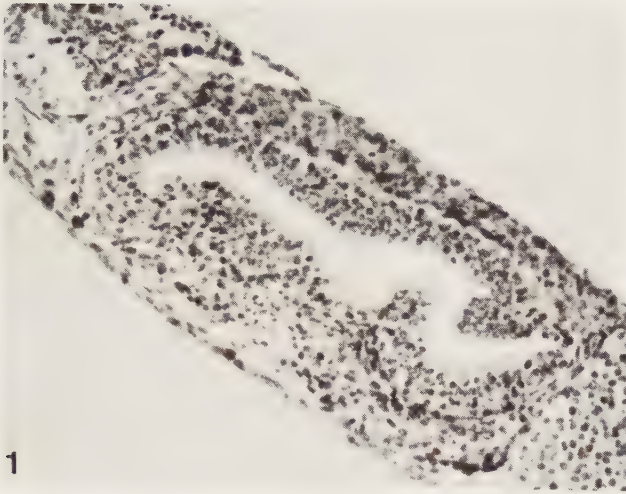




Pl a n c h e X

Association "in vitro" de testicules et vésicules séminales de nouveau - né.

- fig 1. - Vésicules séminales prélevées à la naissance, cultivées 5 jours au contact d'un fragment de testicule prélevé au même stade, et d'un fragment d'hypophyse adulte.  
Noter la hauteur de l'épithélium vésiculaire et la zone claire cytoplasmique vers la lumière. Grossissement 110.
- fig 2. - Même association en culture que sur la fig 1, mais ici le facteur  $F_3$  épiphysaire a été ajouté au milieu de culture. La zone claire cytoplasmique de la vésicule séminale est très réduite. Grossissement 110.
- fig 3. - Vésicules séminales prélevées à la naissance, cultivées 5 jours en présence d'un fragment de testicule du même âge. L'épithélium vésiculaire est peu développé. Grossissement 250.
- fig 4. - Même association en culture que sur la fig 3 mais en présence d'hypophyse embryonnaire. L'épithélium vésiculaire apparaît légèrement stimulé. Grossissement 250.
- fig 5. - Même association en culture que sur la fig 3 mais en présence d'un fragment d'hypophyse adulte : H. Noter la hauteur et les cinèses épithéliales ainsi que le développement de la zone claire cytoplasmique. Grossissement 480.
- fig 6. - Même association en culture que sur la fig 5, ici le facteur  $F_3$  épiphysaire a été incorporé au milieu de culture. La hauteur de l'épithélium et la zone claire cytoplasmique apparaissent réduites. Grossissement 480.







P l a n c h e    X I

Réponse "in vitro" du tissu interstitiel embryonnaire ( fin de gestation )  
aux hormones gonadotropes.

Même fixation et coloration que pour les planches I, II, III.

fig 1. - Témoin incubé 1 h 30 . Grossissement 430.

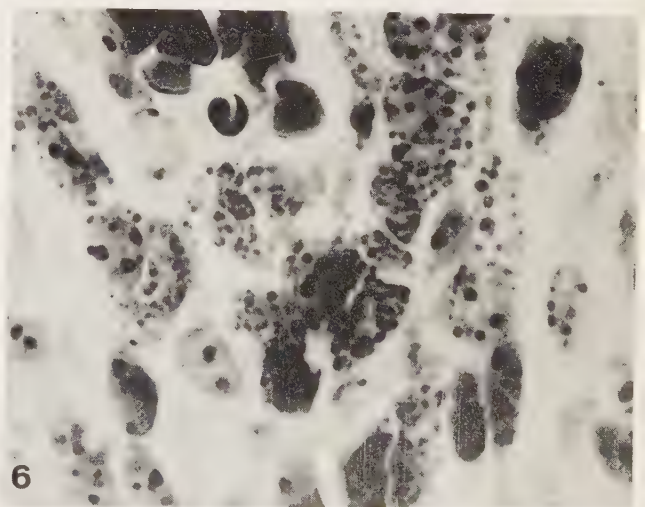
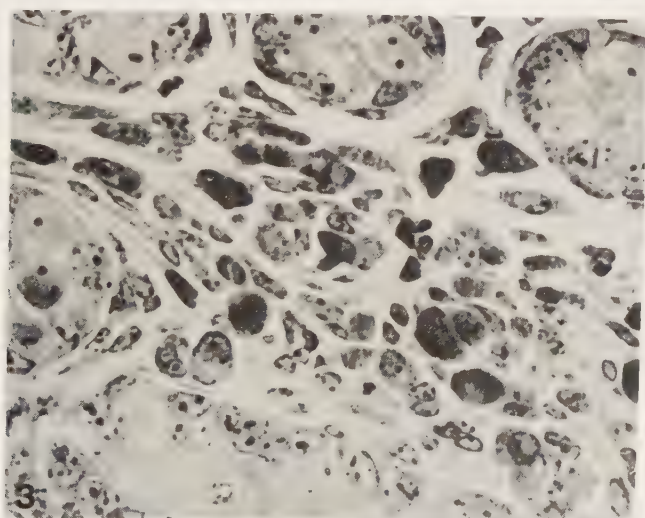
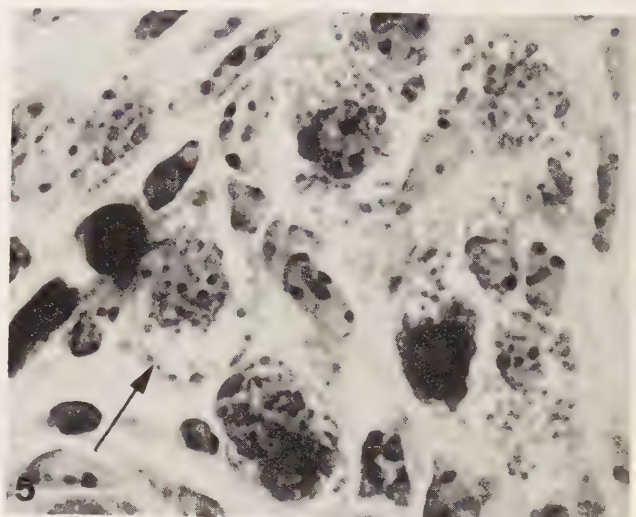
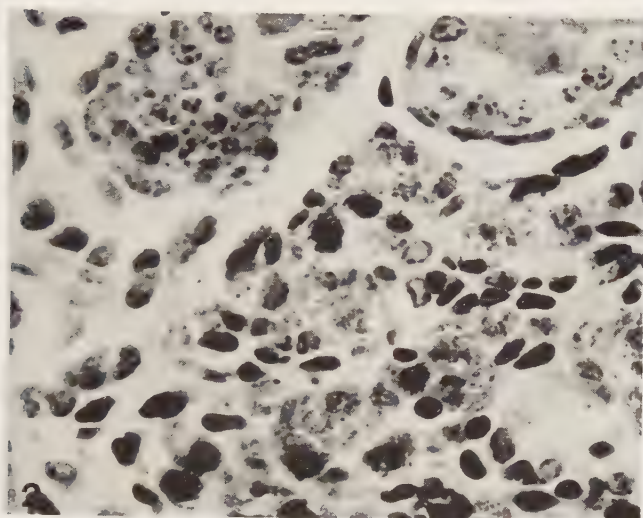
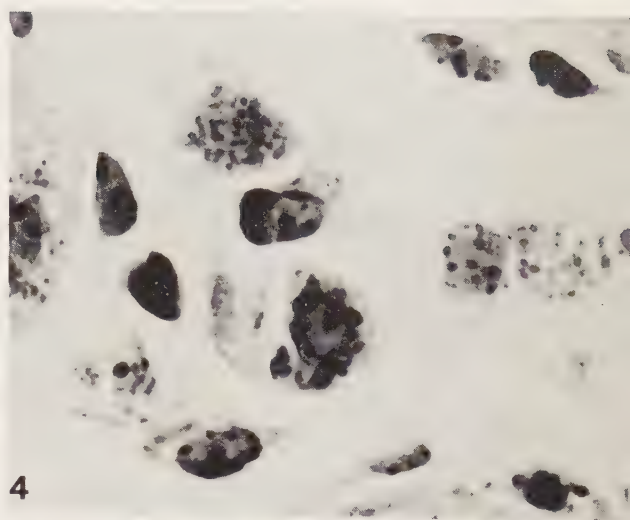
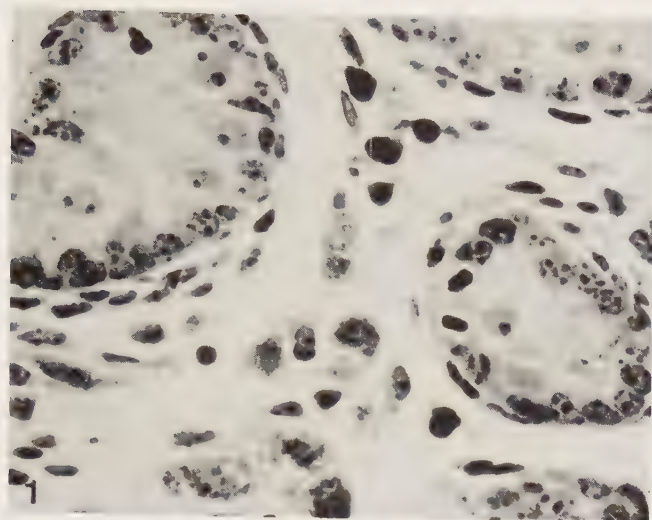
fig 2. - Testicule incubé 1 h 30 avec FSH et LH (  $6\mu\text{g}$  ). Noter l'augmentation des inclusions lipidiques dans le cytoplasme des cellules de Leydig. Grossissement 480.

fig 3. - Testicule incubé 12 h avec LH (  $2\mu\text{g}$  ); les cellules interstitielles apparaissent beaucoup moins chargées en vacuoles lipidiques mais leur fuchsinophilie est devenue très intense. Grossissement 480.

fig 4. - Témoin incubé 1 h 30 . Grossissement 1200 .

fig 5. - Testicule incubé 1 h 30 avec FSH et LH (  $6\mu\text{g}$  ); de larges flaques lipidiques sont apparues dans le cytoplasme des cellules de Leydig. Grossissement 1200 ).

fig 6. - Testicule incubé 12 h en présence de LH (  $2\mu\text{g}$  ). Nombreux gros grains fuchsinophiles; aspect d'intense activité sécrétoire. Grossissement 1200 .







P l a n c h e    XII

Testicule embryonnaire de 18 jours.

Réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D après une heure de préincubation à 37°. Obj. X 10.

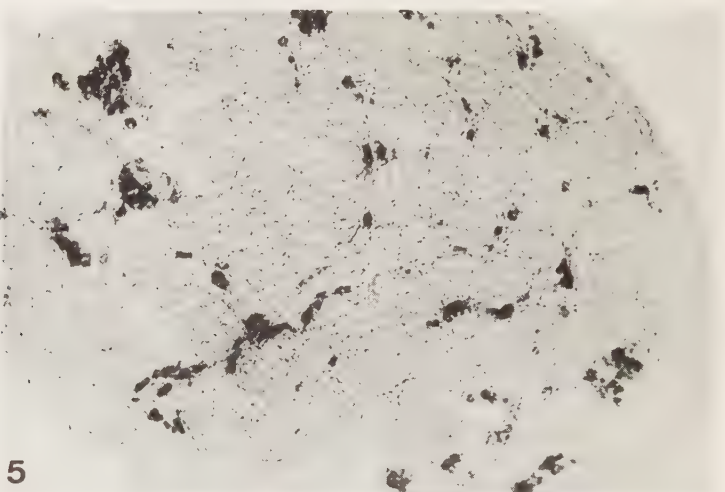
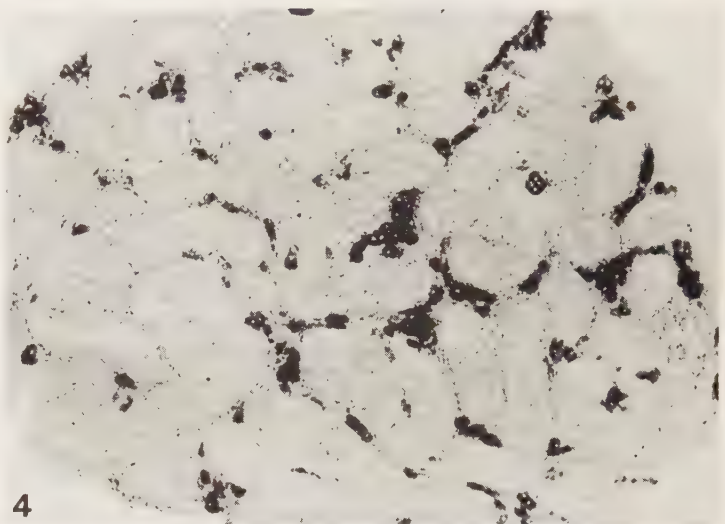
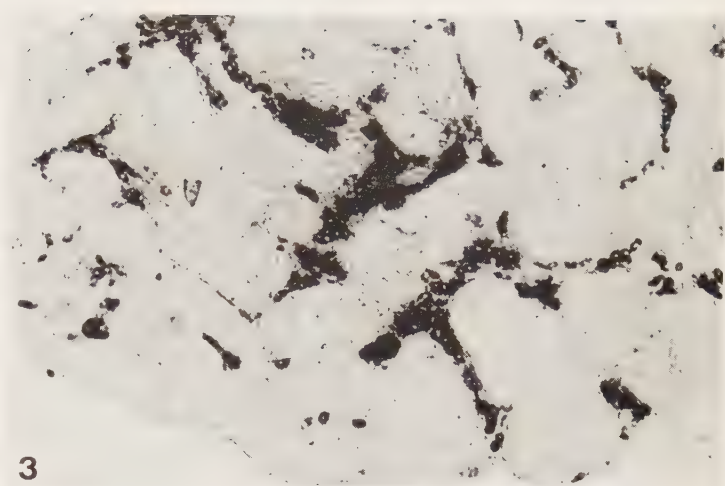
fig 1. - Testicule préincubé dans du milieu témoin.

fig 2. - Testicule témoin ( substrat sans stéroïde ).

fig 3. - Testicule préincubé dans du milieu contenant une forte dose  
(  $6\mu\text{g}$  ) d'hormones gonadotropes purifiées FSH et LH.  
On remarque une légère stimulation de la réaction.

fig 4. - Testicule préincubé dans du milieu contenant  $2\mu\text{g}$  de LH purifiée.  
Très légère stimulation de la réaction.

fig 5. - Testicule préincubé dans du milieu contenant  $4\mu\text{g}$  de FSH purifiée. Pas de stimulation par rapport à la fig 1.







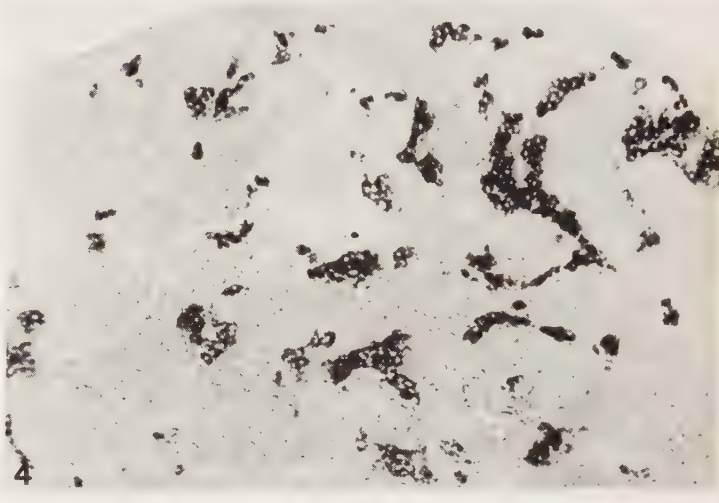
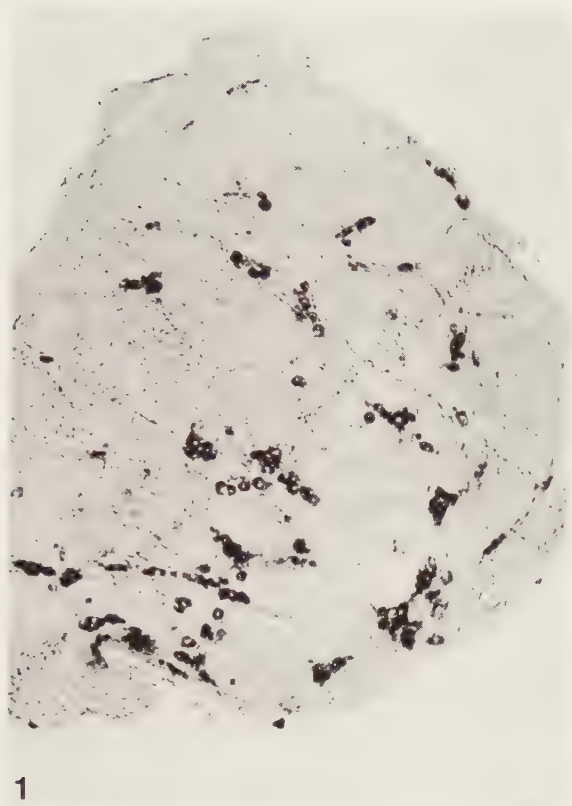
P l a n c h e   XIII

Testicule embryonnaire de 18 jours.

Réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D après 1 h 30 de préincubation à 37°.

Obj. X 10.

Mêmes catégories que sur la planche précédente. Pas ou peu d'augmentation de la stimulation en fonction du temps.







P l a n c h e    X I V

Testicule embryonnaire de 18 jours.

Réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D après 12 h de préincubation à 37 °.

Obj. X 10.

fig 1. - Testicule préincubé dans du milieu témoin.

fig 2. - Testicule témoin ( substrat sans stéroïde ).

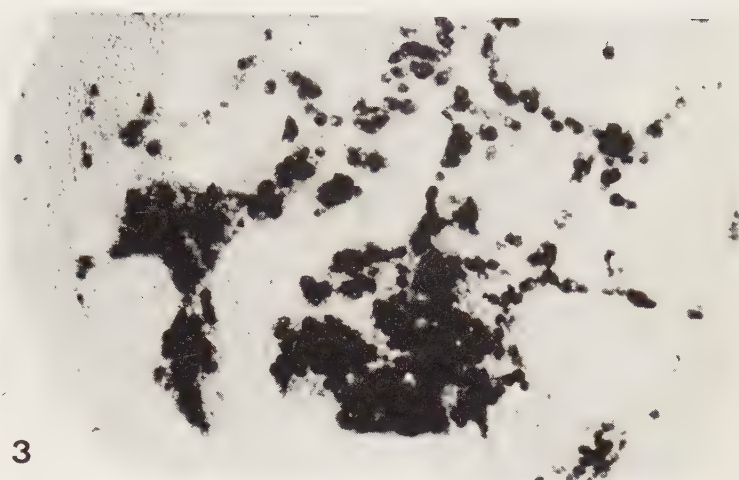
fig 3. - Testicule préincubé dans du milieu contenant une forte dose  
( 6  $\mu$  g ) d'hormones gonadotropes purifiées FSH et LH. La réaction  
est fortement stimulée dans l'interstitielle; on remarque un  
certain développement du diamètre des cordons.

fig 4. - Testicule préincubé dans du milieu contenant 2  $\mu$  g de LH purifiée.  
La réaction dans l'interstitielle apparaît au maximum de son  
intensité.

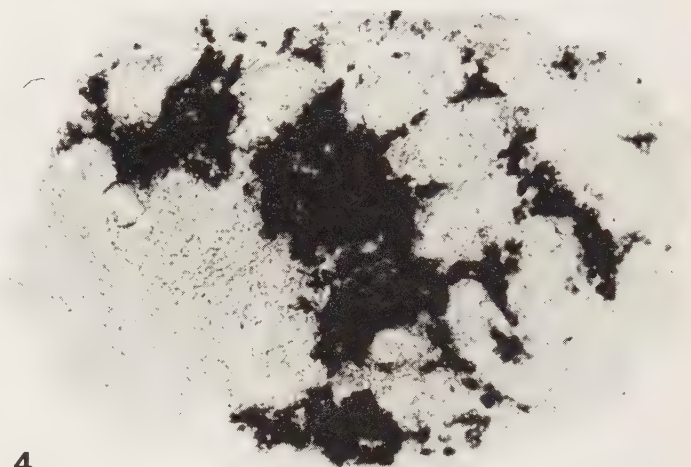
fig 5. - Testicule préincubé dans du milieu contenant 4  $\mu$  g de FSH purifiée.  
La réaction apparaît intensément stimulée par rapport au témoin  
( fig 1 ). D'autre part, on remarque un important développement  
des cordons sous l'action de l'hormone hypophysaire.



1



3



4



2



5





P l a n c h e    X V

Aspect de la réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D dans les cultures "in vitro" de gonades prélevées au 11<sup>e</sup> jour de gestation, avant leur différenciation sexuelle.

fig 1, 2 et 3. - Obj. X 40.

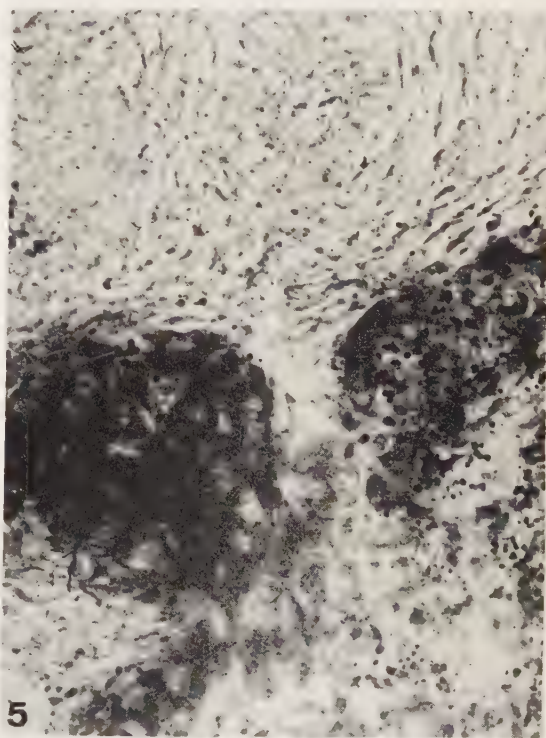
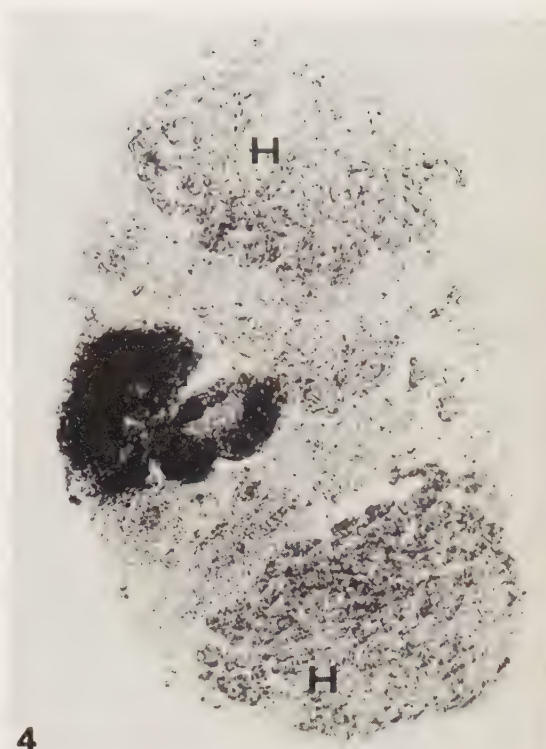
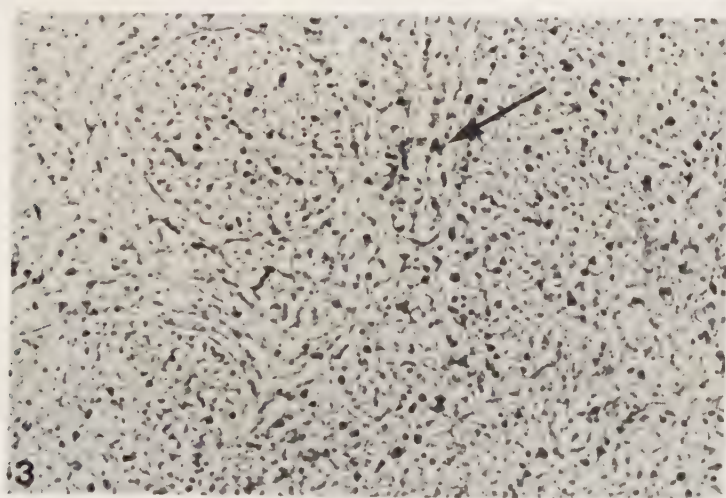
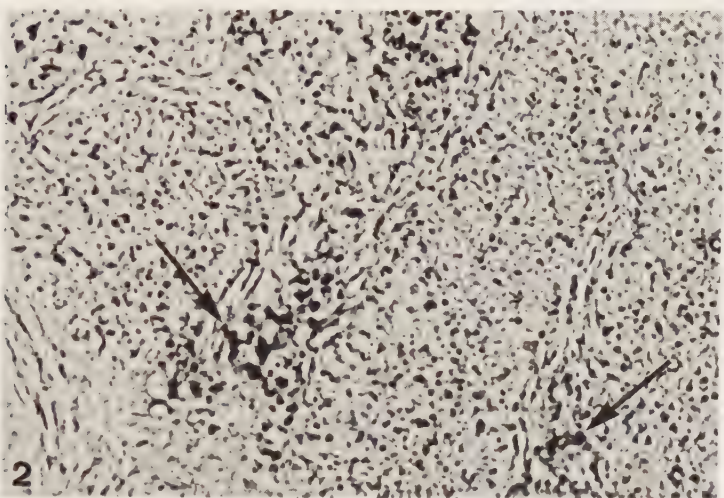
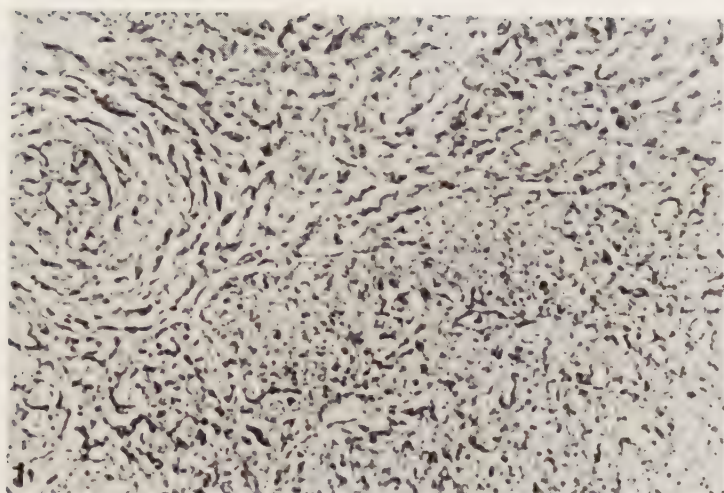
fig 1. - Gonade cultivée 4 jours en présence d'hypophyse. Coupe incubée sans stéroïde. On constate que les cordons testiculaires se sont ébauchés en culture.

fig 2. - Gonade cultivée 4 jours en présence d'hypophyse mâle adulte. Entre les cordons qui se sont ébauchés in vitro, on voit que la réaction  $\Delta^5-3\beta$  - H S D est apparue dans l'interstitielle.

fig 3. - Gonade cultivée 4 jours en présence d'un tissu de soutien ( membre ). Même aspect morphologique que dans le cas précédent mais la réaction enzymatique est beaucoup moins développée.

fig 4. - Obj. X 10. Aspect général de l'association en culture gonade-hypophyse. Après 6 jours in vitro, les cellules interstitielles enzymatiquement actives apparaissent groupées au centre de l'explant gonadique, elles sont entourées par des cordons sexuels qui se sont ébauchés in vitro.

fig 5. - Obj. X 40. Détail de la fig 4 pris à la jonction entre le tissu interstitiel et le tissu germinatif.







P l a n c h e XVI

Aspect de la réaction  $\Delta^5 - 3\beta$  - H S D dans les testicules explantés "in vitro"  
en présence ou en absence d'hypophyse .

fig 1, 2, 3, 4 et 6 : obj. X 10.

fig 1. - Testicule foetal de 14 jours cultivé 7 jours avec deux fragments d'hypophyse mâle adulte. Réaction enzymatique très intense entre les cordons bien délimités.

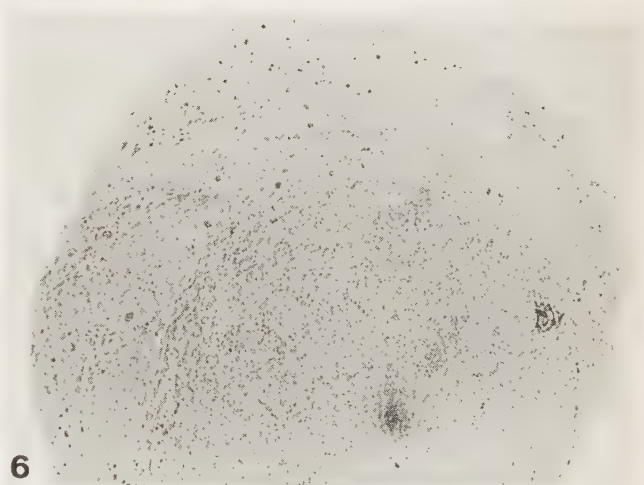
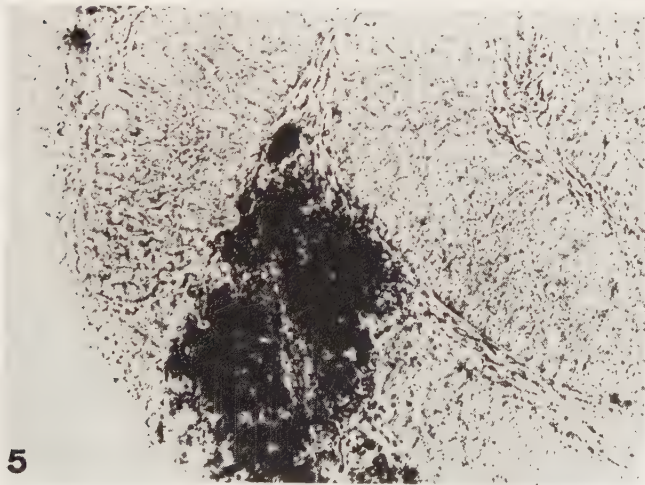
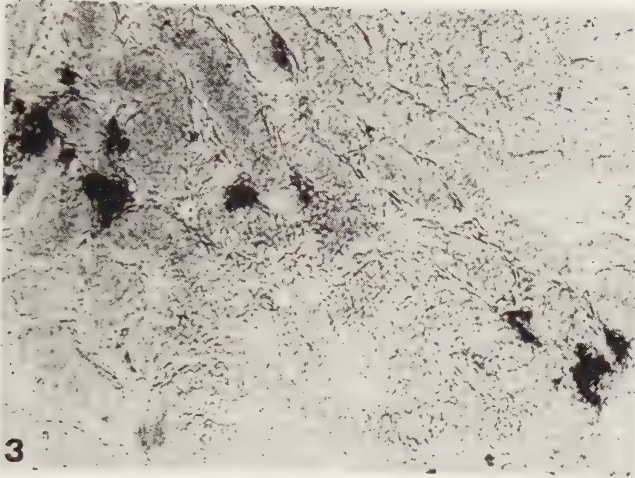
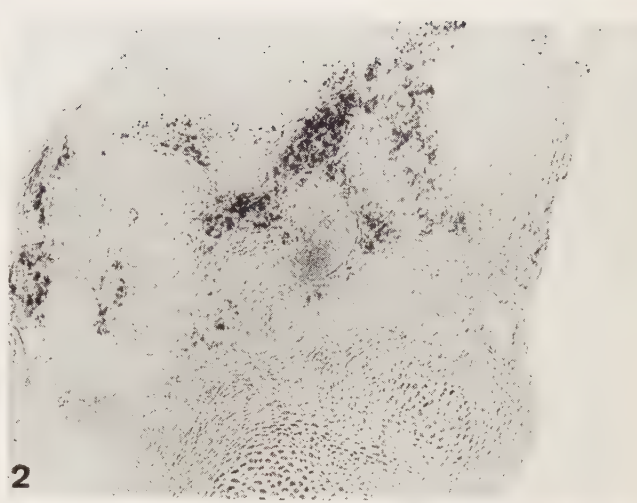
fig 2. - Testicule foetal de 14 jours cultivé 7 jours en présence d'un tissu de soutien ( membre ). Réaction bien délimitée mais moins intense.

fig 3. - Testicule de 3 jours post partum associé in vitro pendant 3 jours à du tissu de soutien ( coeur ).

fig 4. - Testicule de 3 jours post partum associé in vitro pendant 3 jours à de l'hypophyse mâle adulte.

fig 5. - Obj. X 40. Détail de la figure précédente.

fig 6. - Testicule foetal explanté avec de l'hypophyse, incubé sans stéroïde. Obj. X 10.







P l a n c h e XVII

Aspect histologique des testicules embryonnaires de 18 jours cultivés  
35 heures dans les mêmes conditions que les cultures en présence de  $^{32}\text{P}$ .

Fixation : Helly postchromé. Coloration : trichrome Hémalun - éosine safran.  
Grossissement : 410.

fig 1. - Testicule embryonnaire cultivé seul. Cellules interstitielles fuchsinophiles ( C I ).

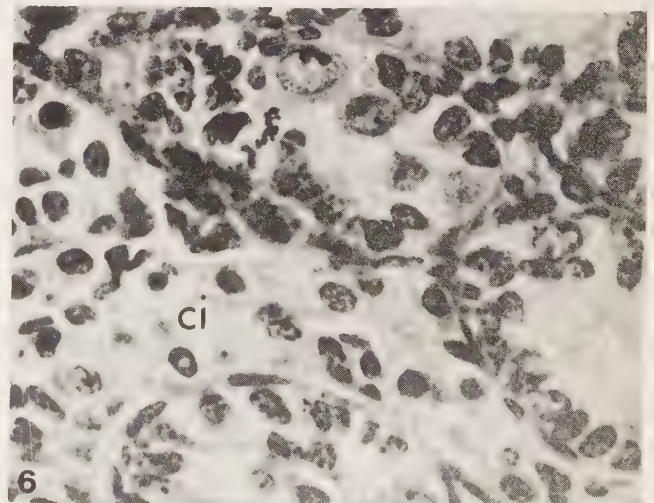
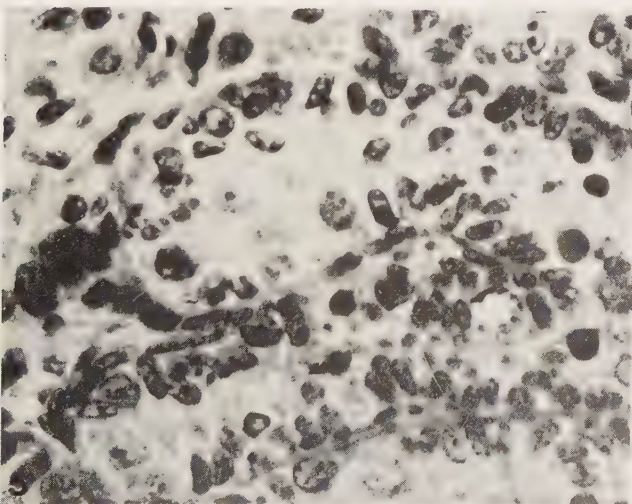
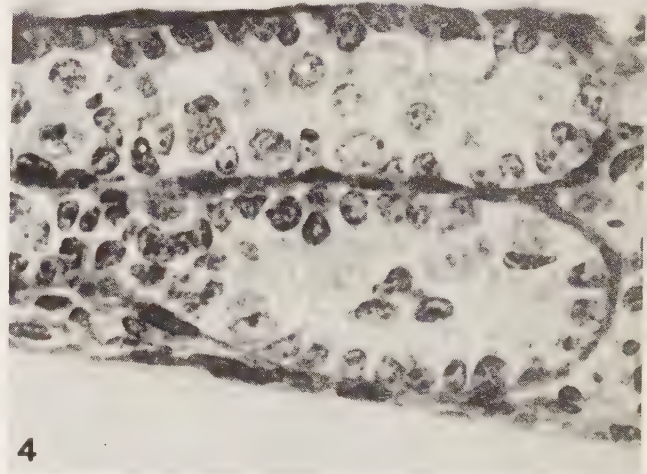
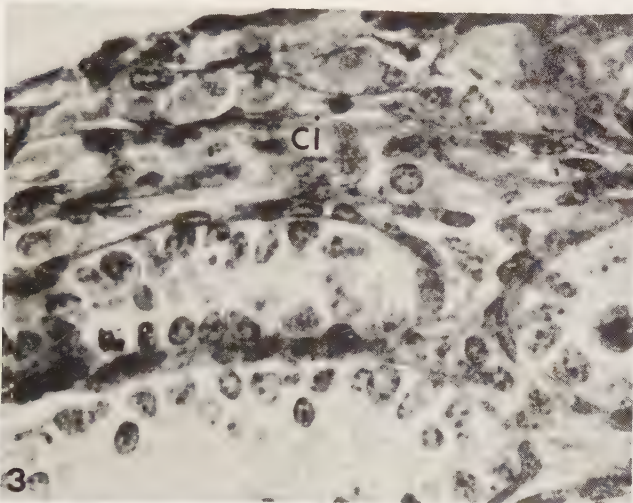
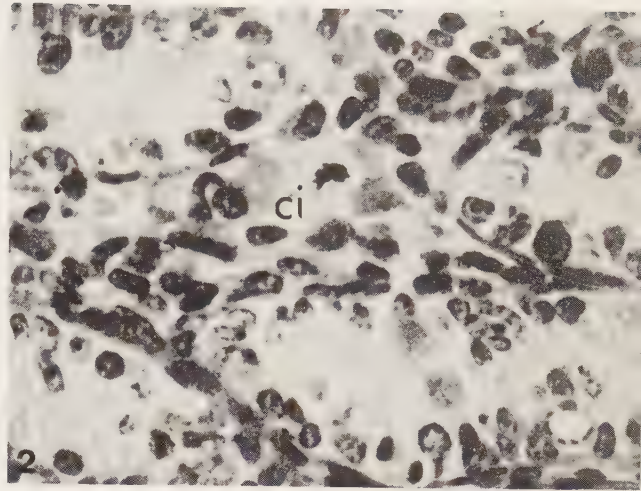
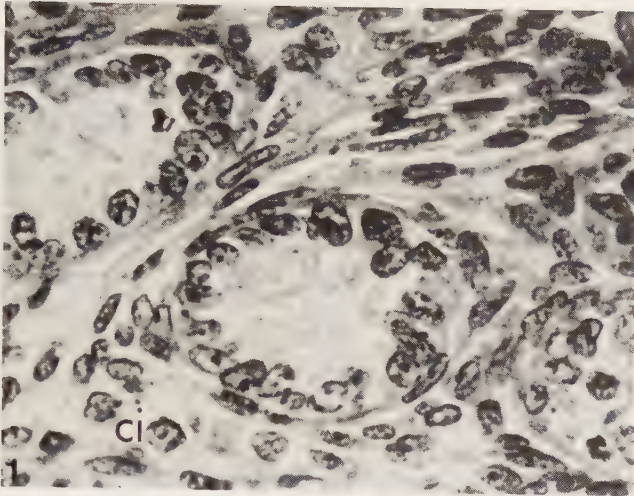
fig 2. - Testicule de 18 jours cultivé en présence d'hormone LH purifiée (  $2\mu\text{g}$  ). Cellules interstitielles très fuchsinophiles. Cinèses.

fig 3. - Testicule de 18 jours cultivé en présence d'hormone FSH purifiée (  $1\mu\text{g}$  ). Cellules interstitielles hyperplasiées et très fuchsinophiles.

fig 4. - Même culture que la précédente figure avec une dose de  $3\mu\text{g}$  de FSH. Remarquer le développement des cordons et les très nombreux gonocytes qu'ils contiennent.

fig 5. - Testicule de 18 jours cultivé en présence de FSH (  $4\mu\text{g}$  ) et de LH (  $2\mu\text{g}$  ); aspect dilaté des cordons; nombreuses cellules germinales.

fig 6. - Même culture. Aspect des îlots de Leydig hypertrophiés et hyperactifs.







P l a n c h e XVIII

Testicules embryonnaires cultivés pendant 3 - 4 jours. Réponse aux hormones gonadotropes.

Fixation : Helly postchromé pour les fig 1, 2, 5 et 6, Bouin - Hollande sublimé pour les fig 3 et 4 .

Grossissement : Obj. immersion ( X 1000 ).

fig 1. - Testicule en voie de différenciation ( 12  $\frac{1}{2}$  jours ); les premiers cordons se sont formés *in vitro* ( c ) les cellules interstitielles se sont multipliées et différenciées en culture. Cinèse. Coloration A. P. S.

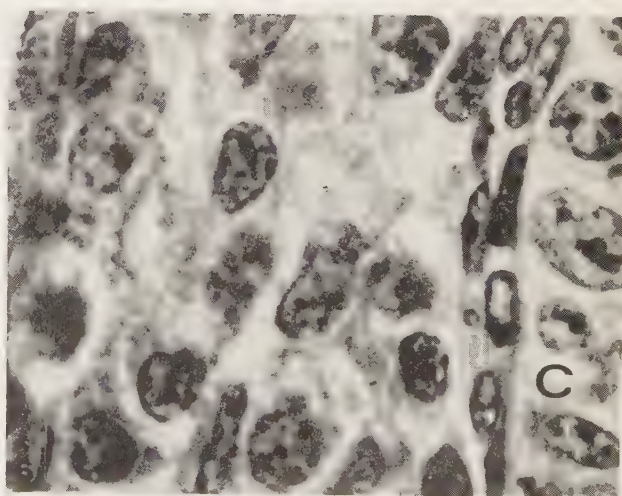
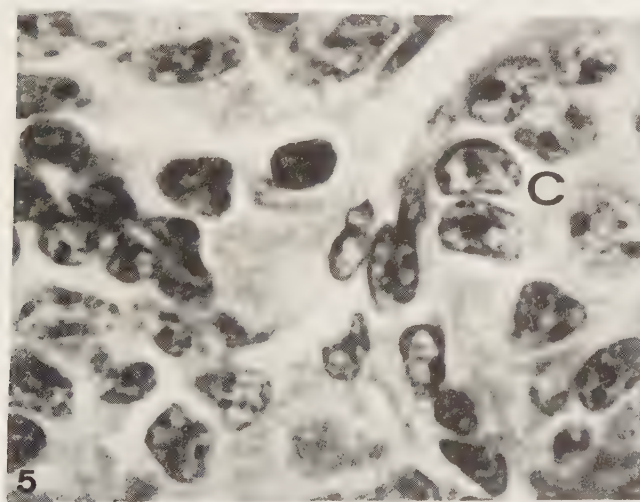
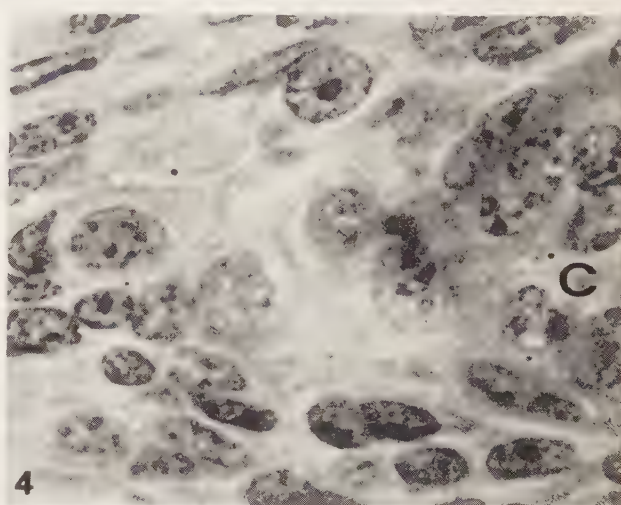
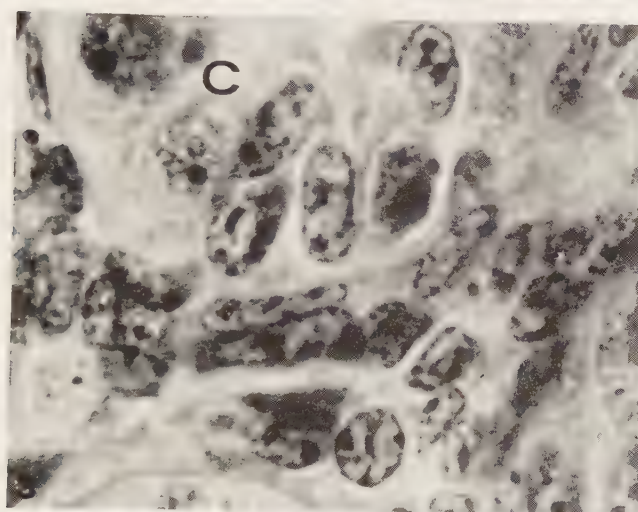
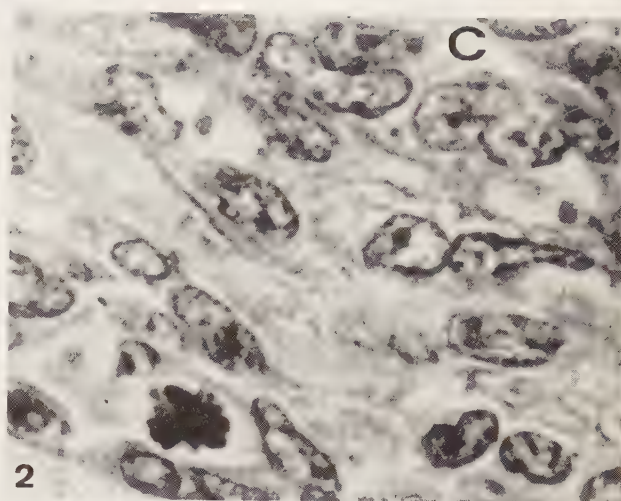
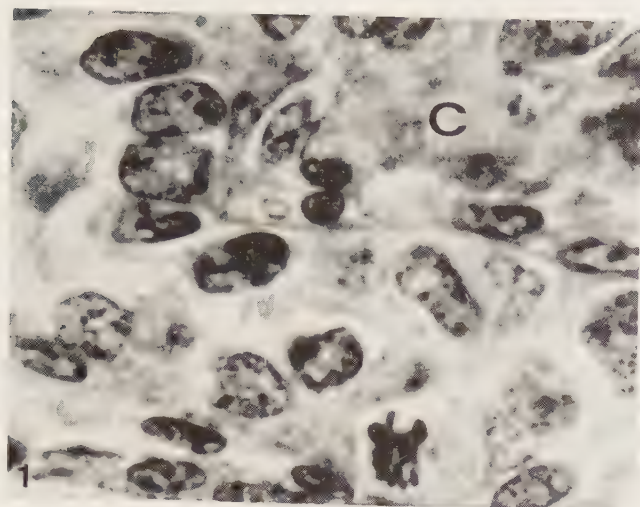
fig 2. - Même tissu cultivé dans du milieu enrichi en FSH et LH ( 6  $\mu$ g ). Même aspect histologique; à ce stade le développement de la gonade et la différenciation cellulaire ne paraissent pas avoir été stimulés par la dose d'hormones gonadotropes fournie. Coloration : A. P. S.

fig 3. - Testicule de 13 jours cultivé en présence d'hypophyse du même âge. Les cordons se sont développés en culture, le cytoplasme du tissu interstitiel présente des signes d'activité sécrétoire. ( réaction A. P. S. positive ).

fig 4. - Testicule de 13 jours cultivé en présence de deux fragments d'hypophyse mâle adulte; peu de différence de taille des cordons; le cytoplasme de l'interstitielle est dilaté et A. P. S. positif.

fig 5. - Testicule explanté à 14 jours et cultivé en présence d'hypophyse du même âge; la croissance des cordons s'est poursuivie in vitro, les flots d'interstitiel sont de plus grande taille et les cellules sont très fuchsinophiles. ( coloration : Masson - Benoit - Staubli ).

fig 6. - Même explant mais en association avec deux fragments d'hypophyse mâle adulte. Le tissu de Leydig est très hyperactif et hypertrophié. ( Coloration : Masson - Benoit - Staubli ).







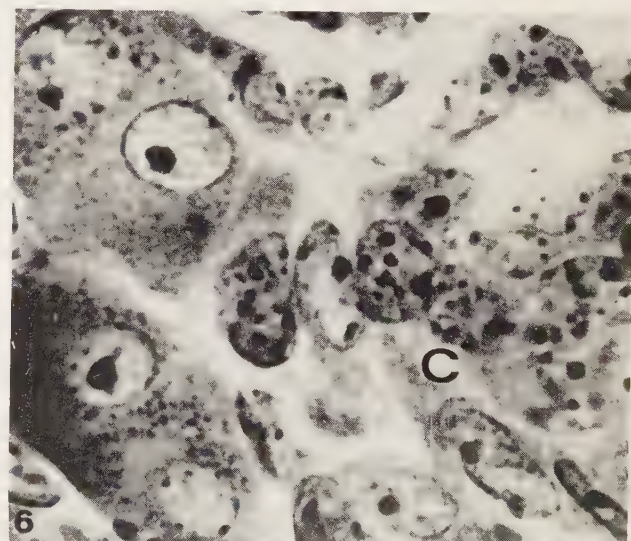
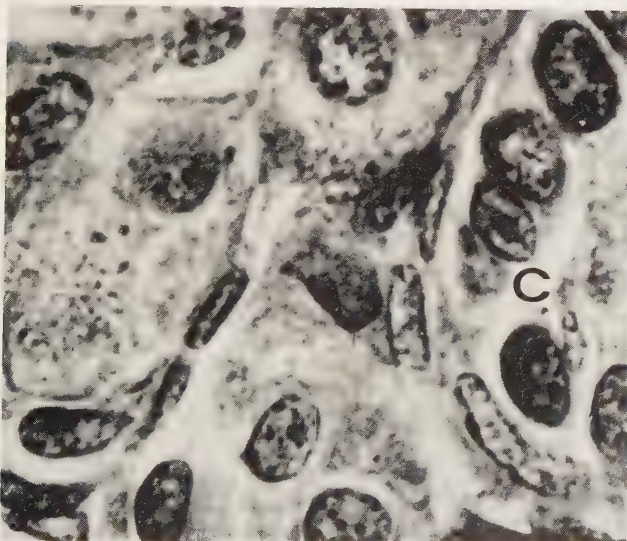
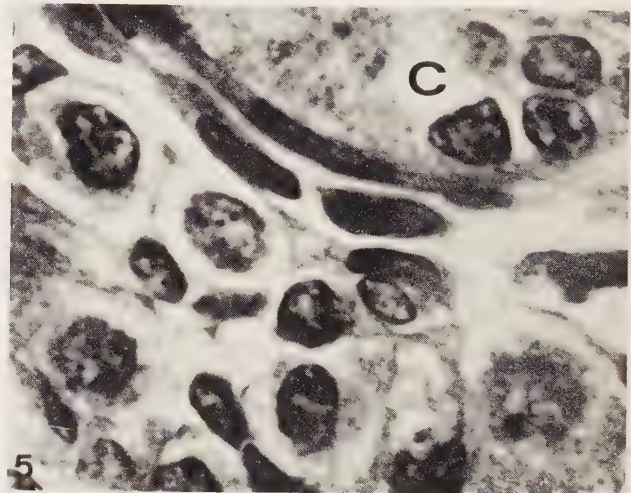
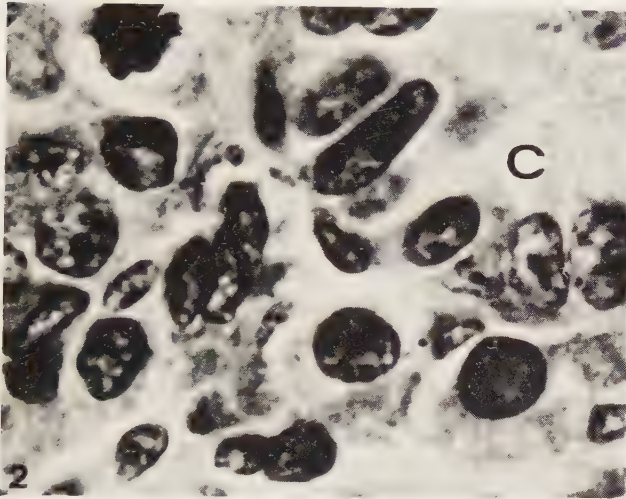
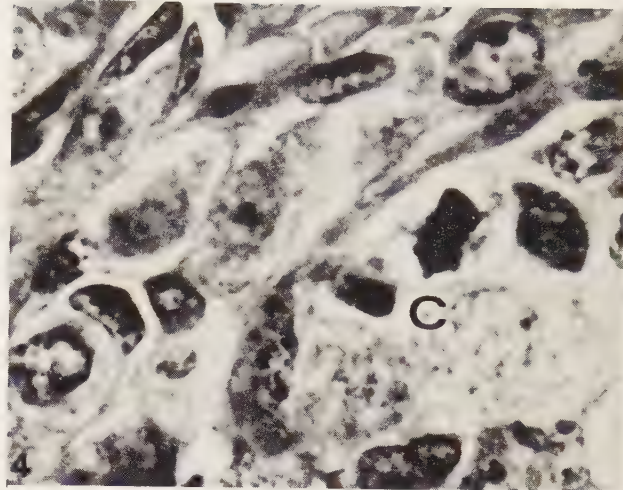
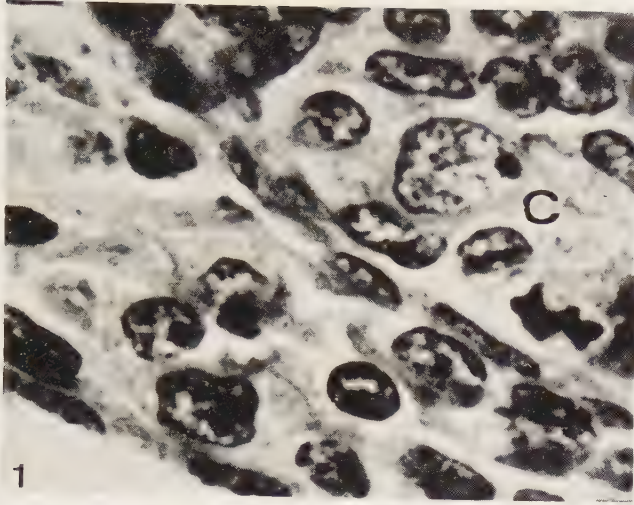
P l a n c h e    X I X

Testicule embryonnaire cultivé pendant une semaine.

Fixation : Helly postchromé. Coloration : Hémalun - éosine - safran  
( fig 1 - 5 ), Masson - Benoit - Staübli ( fig 6 ).

Grossissement : immersion ( X 1000 ).

- fig 1. - Testicule de 16 jours cultivé en association avec deux fragments de myocarde embryonnaire. Tissu interstitiel actif.
- fig 2. - Même explant associé à deux fragments d'hypophyse de 16 jours. Les cellules de Leydig sont hypertrophiées et les cordons dilatés par rapport au témoin ( fig 1 ).
- fig 3. - Même explant associé à deux fragments d'hypophyse mâle adulte. Hyperplasie et hyperactivité des cellules interstitielles glandulaires.
- fig 4. - Testicule de 18 jours cultivé seul. Les vacuoles lipidiques caractéristiques du cytoplasme des cellules de Leydig chez le fœtus à terme sont apparues en culture.
- fig 5. - Même explant associé à deux fragments d'hypophyse de 18 jours. La taille des cellules et des flots de Leydig est hypertrophiée par rapport à la culture témoin ( fig 4 ).
- fig 6. - Testicule de 18 jours cultivé en présence d'une forte dose de FSH purifiée (  $10\mu\text{g}$  ). Les cellules interstitielles sont hypertrophiées et bourrées de granules très fuchsinophiles. Leur activité en réponse à l'hormone gonadotrope paraît beaucoup plus stimulée encore qu'à l'âge de 16 jours ( fig 3 ) en présence d'hypophyse mâle adulte ( FSH + LH ).





## Références bibliographiques



- ALLEN, E. 1949. - Studies on degenerating sex cells in immature mammals. I. An analysis of degeneration in primordial and large germ cells in male albino Rats aged 1 - 9 days. J. morphol., 85, 405 - 421.
- AMOROSO, E.C. 1955. - De la signification du placenta dans l'évolution de la gestation chez les animaux vivipares. Ann. Endocr. (Paris), 16, 435 - 447.
- AMOROSO, E.C. et PORTER, D.G. 1966. - In : The pituitary gland, ed. by G.W. Harris and B.T. Donovan, 2, University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- ANDERSEN, D. et WOLF, E. 1934. - Pinealectomy in Rats. J. Physiol. (London), 81, 49.
- ARON, M. 1921. - Sur la glande interstitielle du testicule embryonnaire chez les Mammifères. C.R. Soc. Biol. (Paris), 85, 107 - 110.
- ARON, M. 1930. - Sur l'imperméabilité du placenta à la substance préhypophysaire active sur la thyroïde. C. R. Soc. Biol. (Paris), 113, 151.
- ARON, M. 1933. - Injection d'extrait préhypophysaire au foetus de Cobaye in utero. Action sur les glandes génitales. C. R. Soc. Biol. (Paris), 113, 1069 - 1071.
- ARVY, L. 1962. - Présence d'une activité stéroïde  $3\beta$  - ol déshydrogénasique chez quelques Sauropsidés. C.R. Acad. Sci., 225, 1803 - 1804.
- ASAYAMA, S.U. et FURUSAWA, M. 1961. - Sex differentiation of primordial gonads of the mouse embryo after cultivation in vitro. Jap. J. exp. Morphol., 15, 34 - 47.
- AVERILL, S.E., RAY, E.W. et LYONS, W.R. 1960. - Maintenance of pregnancy in hypophysectomized Rats with placental implants. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 75, 3.
- AXELROD, J. et WEISSBACH, H. 1960. - Enzymatic O - methylation of N - acetyl serotonin to melatonin. Sciences, 131, 1312.
- AXELROD, J. WURTMAN, R.H. et SNYDER, S.H. 1965. - Control of hydroxyindole - O - methyl transferase activity in the Rat pineal gland by environmental lighting. J. Biol. Chem., 240, 949.
- BAILLIE, A.H. 1961. - Observations on the growth and histochemistry of the Leydig tissue in the postnatal prepubertal mouse testis. J. Anat., 95, 357 - 370.
- BAILLIE, A.H. 1964. - Further observations on the growth and histochemistry of the Leydig tissue on the postnatal prepubertal mouse testis. J. Anat., 98, 403 - 419.
- BAILLIE, A.H. 1965. -  $3\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the foetal mouse testis. J. Anat., 99, 507 - 512.
- BAILLIE, A.H., FERGUSSON, N.M. et McHART, D. 1965. - Development in steroid histochemistry. Acad. Press, London, New York.
- BAILLIE, A.H. et GRIFFITHS, K. 1964. -  $3\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mouse Leydig cells. J. Endocrinol., 29, 9 - 17.
- BAILLIE, A.H. et GRIFFITHS, K. 1965 a. -  $3\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase in the foetal mouse Leydig cells. J. Endocrinol., 31, 63 - 66.
- BAILLIE, A.H. et GRIFFITHS, K. 1965 b. - Further observations on  $3\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the mouse Leydig cells. J. Endocrinol., 31, 207 - 215.
- BARGMANN, W. 1943. - Die Epiphysis cerebri. In : Möllendorff (W. von) Handb. mikr. Anat. Menschen 6 part 4, 309 - 502. Berlin, Springer.
- BARRACLOUGH, C.A. et GORSKI, R.A. 1961. - Evidence that hypothalamus is responsible for androgen - induced sterility in the female rat. Endocrinology, 68, 60.
- BEARN, J.G. 1967. - The thymus and the pituitary - adrenal axis in anencephaly. British J. of Exp. Pathol., 49, 136-144.
- BEAULIEU, E.E. 1970. - Séminaire de la Chaire d'Embryologie du Collège de France, organisé par le Professeur E. Wolff.
- BENOIT, J. 1929. - Structure, origine et fonction des cellules interstitielles du testicule chez le Coq domestique. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 25, 173 - 188.
- BENOIT, J. 1950. - Différenciation sexuelle chez les Oiseaux au cours du développement normal et de l'intersexualité expérimentale par ovariectomie. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 39, 395 - 414.
- BENOIT, J. et STAUBLI, A. 1951. - Modification d'une coloration trichrome de Masson pour la mise en évidence supplémentaire du chondriome. C. R. Ass. Anat., 70, 1027 - 1028.
- BENOIT, J.A.A. 1962. - Le rôle de l'hypophyse dans le développement des embryons de Vertébrés amniotes à sang chaud. Année Biol., 1 fasc. 5 - 6, 297 - 325.
- BERNFELD, M.R. et FELL, P.E. 1967. - Separation of the proliferating and differentiating cell populations of cultured embryonic pancreatic epithelium. Proceed. Nat. Acad. Sci., 58, 2227 - 2234.
- BERTLER, A., FALCK, B. et OWMAN, C. 1963. - Cellular localization of 5 - hydroxytryptamine in the rat pineal gland. Kungl. Fysiografiska Sällskapets i Lund förhandlingar, 33, 13 - 16.

- von BERSWORDT, WALLRABE, R., STEINBECK, H. et NEUMANN, F. 1968. - Effect of FSH on the testicular structure of rats. *Endokrinologie*, 53, 35.
- BJORKLUND, A., ENEMAR, A. et FALCK, B. 1968. - Monoamine in the hypothalamus - hypophyseal system of the mouse with special reference to the ontogenetic aspects. *Z. für Zellforsch.*, 89, 590.
- BORGHESE, E. et VENINI, A. 1956. - Culture in vitro di gonadi embrionali di *Mus musculus*. *Symp. Genet.*, 5, 69 - 83.
- BOUSQUET, J. et MEUNIER, J.M. 1968. - Action de fragment d'hypophyse sur des fragments de gonades de Rats cultivés in vitro ou greffés chez l'animal hypophysectomisé. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 162, 1741 - 1742.
- BOUIN, P. et ANCEL, P. 1903. - Sur la signification de la glande interstitielle du testicule embryonnaire. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 55, 1682 - 1684.
- BRAMBELL, F.W.R. 1927. - The development and morphology of the gonads of the mouse. Part I. The morphogenesis of the indifferent gonad and the ovary. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.*, 101, 391 - 409.
- BRAMBELL, F.W.R. 1928. - The development and morphology of the gonads of the mouse. Part II. The development of the Wolfian body and ducts. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B.*, 102, 206.
- BRENEMAN, W.R. ZELLER, F.J. et CREEK, R.O. 1962. - Radioactive phosphorus uptake by chick testes as an end - point for gonadotrophin assay. *Endocrinology*, 71, 790 - 798.
- BREUER, H. et OZON, R. 1965. - Métabolisme des hormones stéroïdes androgènes et oestrogènes chez les Vertébrés inférieurs. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, 54, 17 - 33.
- BREWER, N.L. 1962. - Sex differentiation of the foetal mouse in vivo. Thesis, PhD, University of Chicago.
- BREWER, G.F. et QUAY, W.B. 1958. - Pineal and hypophyseal phosphate uptake after castration and administration of sex hormones. *Proc. Soc. exp. Biol. Med. N.Y.*, 98, 361.
- BURRILL, M.N. et GREEN, R.R. 1939. - Androgenic function of the adrenals in the immature male castrate rat. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 40, 327.
- DE BURLET, H.M. et DE RUITER, H.J. 1920 - 21. - Zur Entwicklung und Morphologie des Saugerhodens. I. Der Hoden von *Mus musculus*. *Anat. Hefte Beiträge*, 59, 321 - 384.
- CAMPBELL, H.J. 1966. - The development of the primary portal plexus in the median eminence of the rabbit. *J. Anat.*, 100, 381 - 387.
- CANIVENC, C. et MAYER, G. 1953. - Nature du facteur lutéotrophique du placenta de Rat. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 147, 1067 - 1070.
- CERRUTI, R.A. et LYONS, W.R. 1960. - Mammogenic activities of the midgestational mouse placenta. *Endocrinology*, 67, 884 - 887.
- CHIEFFI, G. 1964. - Compartimento istochimico della  $\Delta^5 - 3\beta$  - idrossisteroide deidrogenasi e delle 17 - idrossisteroide deidrogenasi (DPN et TPN dipendenti) nel corticosurrene, nel testicolo e nell'ovario di embrioni e neonati di Ratto. *Atti Soc. Peloritane Sc. fis. mat. nat.*, 10, 515 - 520.
- CHIEFFI, G. 1965. - Onset of steroidogenesis in the vertebrate embryonic gonads. In : *Organogenesis*, Chap. 26, 653 - 671, ed. par R.L. DeHaan et H. Ursprung, New York, Holt, Rinehart et Winston.
- CHIEFFI, G. et BOTTE, V. 1963. - Osservazioni istochimiche sull'attività della steroide -  $3\beta$  - olo - deidrogenasi nell'interrenale e nelle gonadi di girini e adulti di *Rana esculenta*. *Riv. Istoch. norm. pat.*, 9, 172 - 174.
- CHIEFFI, G. et BOTTE, V. 1966. - Il differenziamento istochimico dell'interrenale e dei tessuti somatici della gonade embrionale di *Lacerta sicula*. *Acad. Naz. Lincei*, 39, 582 - 592.
- CHRISTENSEN, A.K. et MASON, N.R. 1965. - Comparative ability of seminiferous tubules and interstitial tissue of the rat testes to synthesize androgens from progesterone 14 C in vitro. *Endocrinology*, 76, 646 - 656.
- CLARK, H.M. 1935 a. - A prepubertal reversal of the sex difference in the gonadotrophic hormone content of the pituitary gland of the rat. *Anat. Rec.*, 61, 175 - 192.
- CLARK, H.M. 1935 b. - A sex difference in the change in potency of the anterior hypophysis following bilateral castration in enwborn rats. *Anat. Rec.*, 61, 193 - 202.
- CLAVET, J. 1933. - Etude du chondriome dans les cellules épiphysaires de quelques Mammifères. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 113, 300 - 301.
- CLEMENTI, F., de VIRGILIIS, G., FRASCHINI, F. et MESS, B. 1966. - Modification of the pituitary morphology following pinealectomy and the implantation of the pineal body in different areas of the brain. Sixth Intern. Congress electron microscopy, Kyoto, Copright Maruzen Co Ltd Nihonbushi, Tokyo, 539 - 540.
- CLERMONT, Y. et PEREY, B. 1957. - Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Amer. J. Anat.*, 100, 241 - 268.
- CLERMONT, Y. et HUCKINS, C. 1961. - Microscopic anatomy of sex cords and seminiferous tubules in growing and adult male albino rats. *Amer. J. Anat.*, 108, 79.

- CLERMONT, Y., LEBLOND, C.P. et MESSIER, B. 1959. - Durée du cycle de l'épithélium séminal du Rat. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 48 bis, 37 - 56.
- COLLENOT, A. 1964. - Mise en évidence histochimique d'une  $\Delta^5 - 3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades non différenciées et en cours de différenciation des mâles génétiques de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michah. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 259, 2535 - 2537.
- COLLENOT, A. 1965. - Recherches comparatives sur l'inversion sexuelle par les hormones stéroïdes chez les Amphibiens. Mémoires Soc. Zool. Fr., 33, 1 - 142.
- COLLENOT, A. 1969. - In : Grassé, Mammifères, 16, fasc. 6, éd. Masson.
- CONTOPOULOS, A.N. et SIMPSON, M.E. 1956. - Increased FSH and ICSH content in the pituitary of the pregnant rats. Anat. Rec., 124, 276 - 277.
- CONTOPOULOS, A.N. et SIMPSON, M.E. 1957. - Presence of trophic hormones in foetal rat hypophysis. Fed. Proc., 16, n° 103.
- CONTOPOULOS, A.N. et SIMPSON, M.E. 1959. - Growth promoting activity of pregnant rat plasma after hypophysectomy and after thyroidectomy. Endocrinology, 64, 1023 - 1031.
- COURVOISIER, S., BACLESSE, M. et GUYON, L. 1952. - Influence de la cryptorchidie et de la castration sur le fonctionnement gonadotrope hypophysaire déterminée sur le Rat par greffe ovarienne. C. R. Soc. Biol. ( Paris ), 146, 1653 - 1656.
- DESCLIN, L. 1934. - Contribution à l'étude expérimentale des rapports entre l'hypophyse et le tractus génital. Hypophyse de castration et hypophyse de grossesse. Arch. Biol., 45, 503 - 569.
- DES GOUTTES, M.N. 1964a. - Etude de quelques effets de la castration pratiquée à la naissance chez le Rat mâle. C. R. Soc. Biol. ( Paris ), 158, 1260 - 1267.
- DES GOUTTES, M.N. 1964 b. - Etude préliminaire des corrélations hypophyso - génitales chez le Rat mâle de la naissance au sevrage. J. Physiol., 56, 556 - 557.
- DICKSON, A.D. et BULMER, D. 1960. - Observations on the placental giant cells of the rat. J. Anat. ( Londres ), 94, 418.
- DILL, R.E. et WALKER, B.E. 1966. - Pineal cell proliferation in the mouse. Proc. Soc. exp. Biol., 121, 911 - 912.
- DONOVAN, B.T. 1966. - The regulation of the secretion of follicle - stimulating hormones. In : Harris and Donovan "The pituitary gland", University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- DUBOIS, R. 1967. - Localisation et migration des cellules germinales du blastoderme non incubé de Poulet d'après les résultats de culture in vitro. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 56, 245 - 264.
- DUX, L. 1939. - Recherches sur les cultures de testicules hors de l'organisme. Action de l'hormone gonadotrope. Arch. Anat. micr., 35, 391 - 413.
- EBELS, I. et PROP, N. 1965. - Study of the effect of melatonin on the gonads, the oestrus cycle and the pineal organ of the rat. Acta endocrinol. ( Kbh ), 49, 567.
- EBELS, I., MOSZKOWSKA, A. et SCEMAMA, A. 1965. - Etude in vitro des extraits épiphysaires fractionnés. Résultats préliminaires. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 260, 5126.
- EDELMAN, J.C., BRENDLER, H., ZORGNIOTTI, A.W. et EDELMAN, P.M. 1963. - Effects of castration on mitochondria of rat ventral prostate. Endocrinology, 72, 853.
- EGUCHI, Y. et MORIKAWA, Y. 1968. - Changes in pituitary gonad interrelations during perinatal days in the rat. Anat. Rec., 161, 163.
- ELGER, W. et NEUMANN, F. 1966. - The role of androgens in differentiation of the mammary gland in male mouse foetuses. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 123, 637 - 640.
- ELLIS, L. 1969. - The direct action of melatonin and serotonin on testicular androgen production in vitro. J. Reprod. Fert., 18, 159.
- ELLIS, L. et BERLINER, D.L. 1965. - Sequential biotransformation of 5 - pregnenolone -  $17\alpha$  - 3H and progesterone - 4 - 14 C into androgens by mouse testis. Endocrinology, 76, 591 - 599.
- ENEMAR, A. 1961. - Structure and development of the hypophyseal portal system in the laboratory mouse, with particular regard to the primary plexus. Arkiv. Zool., 13, 203 - 252.
- ENGEL, P. 1935. - Über die antigonadotropen Wirkung des Epiphysen. Wien Klin. Wschr., 48, 1160.
- FALCK, B. 1962. - Observation on the possibilities of the cellular localization of monoamines by fluorescence methods. Acta Physiol. Scand., 56 suppl., 197.
- FALCK, B. et OWMAN, C. 1965. - A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. Acta Univ. Lund II, 7, 1.

- FISCHER, E. 1933. - Isolation and biological assay for an efficaceous of the pineal gland. Arch. Int. Pharmacodyn., 59, 840.
- FIRKET, J. 1920. - On the origin of germ cells in higher vertebrates. Anat. Rec., 18, 309 - 316.
- FLORSHEIM, W.H., VELCOFF, S.M. et BODFISH, F.R. 1954. - Gonadotrophin assay based on augmentation of radio-phosphate uptake by chick testis. Acta Endocrin. ( Kbh ), 30, 179.
- FOLLETT, B.K. et FARNER, D.S. 1966. - Pituitary gonadotropins in the japanese quail ( *Coturnix coturnix japonica* ) during photoperiodically induced gonadal growth. Gen. Comp. Endocr., 7, 125 - 131.
- FORSBERG, J.G., JACOBSON, D. et NORGREN, A. 1968. - Modifications on reproductive organs in male rats influenced prenatally or pre- and postnatally by an "antiandrogenic" steroid ( cyproterone ). Z; Aant. Entwck. 127, 175 - 186.
- GABE, M. 1963. - Histochimie des produits de sécrétion du lobe distal de l'adénohypophyse. In : Cytologie de l'Adénohypophyse. Ed. du CNRS, Paris, publié sous la direction de J. Benoit et C. Da Lage.
- GAILLARD, P.J. et VAROSSIEAU, W.W. 1938. - The structure of explants from different stages of development of the testis on cultivation in media obtained from individuals of different ages. Acta Neerl. Morphol., 1, 313.
- GAINET, M. 1969. - Contribution à l'étude de l'adénohypophyse foetale humaine. Thèse Dr. Médecine, n° 51, Besançon.
- GALLIEN, L. 1938. - Inhibition du cycle sexuel et involution testiculaire consécutive à l'hypophysectomie chez *Rana temporaria*. C. R. Soc. Biol. ( Paris ), 129, 1043 - 1045.
- GALLIEN, L. 1940. - Recherches sur la physiologie hypophysaire dans ses relations avec la gonade et le cycle sexuel chez la Grenouille rousse. Bull. Biol. Fr. et Belg., 74, 1 - 42.
- GALLIEN, L. 1958. - Problèmes et concepts de l'embryologie expérimentale. Colloque " l'Avenir de la Science ", série n° 4 éd. Gallimard.
- GALLIEN, L. 1965. - Genetic control of sexual differentiation in vertebrates. In : Organogenesis, Ed. DeHaan et Ursprung, New York, Holt, Rinehart and Winston.
- GALLIEN, L. et LE FOULGOC, M.T. 1958. - Activité oestrogène dans l'ovaire embryonnaire du Poulet. Vérification par le test biologique de la Ratte castrée ( Allen et Doisy ) de l'identification chimique d'hormones stéroïdes oestrogènes dans l'ovaire gauche du Poulet de 21 jours. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 247, 1776 - 1778.
- GALLIEN, L. et CHALUMEAU - LE FOULGOC, M.T. 1960. - Mise en évidence de stéroïdes oestrogènes dans l'ovaire juvénile de *Xenopus laevis* Dandin et cycle des oestrogènes au cours de la ponte. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 251, 460 - 462.
- GALLIEN, L., CERTAIN, Ph. et OZON, R. 1964. - Mise en évidence d'une  $\Delta^5-3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase dans le tissu interrénal de l'Urodèle *Pleurodeles waltlii* Michali aux divers stades du développement. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 258, 5729 - 5731.
- GAMBAL, D. et ACKERMAB, R.J. 1967. - Hormonal control of rat testicular phospholipids. Endocrinology, 80, 231.
- GARDNER, H.J. 1948. - Development of the pineal body in the hooded rat. Anat. Rec., 103, 538 - 539.
- GARDNER, W. U. et ALLEN, E. 1942. - Effect of hypophysectomy at mid - pregnancy in the mouse. Anat. Rec., 83, 75.
- GARNIER, D. 1964. - Etude des variations des cellules interstitielles du testicule du Canard au cours du cycle annuel. Thèse de Dr. de 3e cycle, Fac. des Sciences de l' Université de Paris.
- GIARMAN, N. et DAY, M. 1958. - Presence of biogenic amines in the bovine pineal body. Biochem. Pharmacol., 1, 235.
- GLYDON, R.S. 1957. - The development of blood supply of the pituitary in the albino rat with special reference to the portal vessels. J. Anat., 91, 237 - 244.
- GOGAN, F. 1969. - Activité comparée des gonadotroïnes aviaires et mammaliennes chez le Poussin. In : Colloque Intern. sur la Spécificité zoologique des hormones hypophysaires et de leurs activités. Ed. M. Fontaine, CNRS, Paris.
- GOLDBERG, B., JONES, G.E.S. et BORKOWF, H.I. 1964. - A histochemical study of substrate specificity of the stéroïde  $3\beta$  - ol dehydrogenase and isomerase systems in human ovary and testis. J. Histochem. Cytochem., 12, 880 - 889.
- GORSKI, R.K. et WAGNER, J.W. 1965. - Gonadal activity and sexual differentiation of the hypothalamus. Endocrinology, 76, 226.
- GOTHIE, S. 1961. - La réponse folliculaire et ovulaire. Emploi des traceurs dans l'étude de la gonadotrophine chorale. Ann. Endocrinol., 15, 579 - 584.
- GREEP, R.O. 1961. - Physiology of the anterior hypophysis in relation to reproduction. In : Sex and Internal Secretions, 3rd Edition, ed. by W.C. Young, Williams and Wilkins, Baltimore.

- GROBSTEIN, C. 1953. - Epithelio mesenchymal specificity in the morphogenesis of mouse sub - mandibular rudiments in vitro. *J. Exptl. Zool.*, 124, 383 - 414.
- GROBSTEIN, C. 1956. - Transfilter induction of tubules in mouse metanephrogenic mesenchyme. *Exp. Cell. Res.*, 10, 426 - 440.
- GROBSTEIN, C. 1964. - Cytodifferentiation and its control. *Science*, 143, 643 - 650.
- GROSSBERG, C. et SCHWARTZ, N.B. 1968. - Pattern in pituitary LH content in male and female rat from infancy to puberty. *Fed. Proc.*, 27, 371.
- GRUNT, J.A. 1964. - Effects of adrenalectomy and gonadectomy on growth and development in the rat. *Endocrinology*, 75, 446 - 451.
- GRUNT, J.A. 1964. - Effects of neonatal gonadectomy on skeletal growth and development in the rat. *Endocrinology*, 75, 805 - 808.
- HAFFEN, K. et CEDAR, L. 1968. - Etude en culture organotypique in vitro, du métabolisme de la déhydroépiandrostènedione et de la testostérone radioactive par les gonades normales et intersexuées de l'embryon de Poulet. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 11, 220 - 234.
- HÅKANSON, R., LOMBARD - DES GOUTTES, M.N. et OWMAN, C. 1965. - Activities of tryptophan hydroxylase, dopa-decarboxylase and monoamine oxydase as correlated with the appearance of monoamines in developing rat pineal gland. *Life Sci.*, 6, 2577.
- HAMACHER, M. 1968. - Das histochemische Verhalten einiger Dehydrogenasen im Hoden von Ratte, Maus und Meer-schweinchen nach Oestrogen und ICSH - Behandlung. *Acta Histochem.*, 30, 79 - 89.
- HAMBURGER, C. 1957. - The assay of gonadotrophic hormones. A survey. *Acta Endocr. (Kbh)*, suppl., 31, 59.
- HARGITT, G.T. 1925. - The formation of the sex glands and germ cells of Mammals. I. - The origin of the germ cells in the albino rat. *J. Morphol.*, 40, 517.
- HARRIS, G.W. 1964. - Sex hormones, brain development and brain function. The Upjohn lecture of the Endocrine Society of America. *Endocrinology*, 75, 627.
- HARRIS, G.W. et JACOBSON, D. 1952. - Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc. Roy. Soc. B* 139, 263.
- HARRIS, G.W. et LEVINE, S. 1962. - Sexual differentiation of the brain and its experimental control. *J. Physiol.*, 163, 42 - 43.
- HARRIS, G.W. et CAMPBELL, H.J. 1966. - The regulation of the secretion of luteinizing hormone and ovulation. In : Harris and Donovan, "The pituitary gland", University of California Press, Berkeley and Los Angeles.
- HART, Mc D., BAILLIE, A.H., GALMAN, K.C. et FERGSON, M.M. 1966. - Hydroxysteroid dehydrogenase development in mouse adrenals and gonads. *J. Anat.*, 100, 801 - 812.
- HAYASHIDA, T. 1966. - Immunological reactions of pituitary hormones. In : "The pituitary gland", ed. by Harris and Donovan, University of California Press, 2, 613 - 670.
- HERLANT, M. 1949. - Application de la réaction de Mac Manus à l'étude histophysiologique du lobe antérieur de l'hypophyse. *Rev. Can. Biol.*, 2, 113 - 117.
- HERLANT, M. 1960. - Etude critique de deux techniques nouvelles destinées à mettre en évidence les différentes catégories cellulaires présentes dans la glande pituitaire. *Bull. micr. Appl.*, 10, 37 - 44.
- HILSCHER, W. et MAKOSKI, H.B. 1968. - Histologische und autoradiographische Untersuchung zur "präspmatogenese" und "Spermatogenese". *Z. Zellforsch.*, 86, 327 - 350.
- HISAW, F.L. et ASTWOOD, E.V. 1942. - The physiology of reproduction. *Ann. Physiol. Rev.*, 4, 503 - 560.
- HITZEMAN, J.W. 1962. - Development of enzyme activity in the Leydig cells in the mouse testis. *Anat. Rec.*, 143, 351.
- HOVARDS, A. et PELC, S.R. 1949. - 32 P autoradiographs of mouse testis. *Heredity*, 3, 383.
- HUCKINS, C. 1963. - Changes in gonocytes at the time of initiation of spermatogenesis in the Rat. *Anat. Rec.*, 145, 243 abstr.
- HUCKINS, C. 1965. - The initiation of spermatogenesis in the testis of the Wistar albino rat. PhD Thesis, McGill University.
- HUSEBY, R.A., DOMINGUEZ, O.V. et SAMUELS, L.T. 1961. - Function of normal and abnormal testicular interstitial cells in the mouse. *Rec. Prog. Hormone Res.*, 17, 1 - 61.
- HYPPA, M. 1969. - Differentiation of the hypothalamic nuclei during ontogenetic development in the rat. *Z. Anat. Entwickl.*, 129, 41.
- ICHIHARA, I. 1969. - Cholesterol changes in developing testicular interstitial cells of the mouse : histochemical and biochemical study. *Anat. Rec.*, 163, 595 - 602.

- ISAWA, Y. 1926. - On some anatomical changes which follows removal of the pineal body from both sexes of the immature rats. *Amer. J. Physiol.*, 77, 126.
- ITO, M. et MATSUSHIMA, S. 1968. - Effect of gonadectomy and hypophysectomy on the pineal body of the mouse : a quantitative morphological study. *Anat. Rec.*, 162, 479.
- JACOBSON, D. 1965. - Some effects of sex hormones on the fetus and newborn in relation to later reproductive functions. *Acta Univer. Lundensis (Lund)*, section II, n° 17, 1 - 19.
- JOHNSON, C. et LAHR, E. 1952. - Pineal implants in rats. *Anat. Rec.*, 54 suppl. 3, 28.
- JOHNSTON, P.M. 1951. - The embryonic history of the germ cells of the large mouth black bass *Micropterus salmoides salmoides* (Lacepede). *J. Morphol.*, 88, 491 - 542.
- JOST, A. 1947. - Recherches sur la différenciation de l'embryon de Lapin. II. Action des androgènes sur l'histogénèse génitale. *Arch. Anat. micr. morphol. exp.*, 36, 242.
- JOST, A. 1947. - Recherches sur la différenciation de l'embryon de Lapin. III. Rôle des gonades foetales dans la différenciation sexuelle somatique. *Arch. Anat. micr. morphol. exp.*, 36, 271.
- JOST, A. 1947. - The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 66, 302.
- JOST, A. 1950. - Sur le contrôle hormonal de la différenciation sexuelle du Lapin. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, 39, 577 - 598.
- JOST, A. 1953. - Problem of fetal endocrinology : the gonadal hypophyseal hormones. *Recent Progress Horm. Res.*, 8, 379.
- JOST, A. 1961. - L'hypophyse foetale. In *Histophysiologie du complexe hypothalamo - hypophysaire*. Séminaire du Collège de France, Paris, 175 - 183.
- JOST, A. 1966. - Anterior pituitary function in foetal life. In : "The pituitary gland", ed. by Harris and Donovan, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, 2, 299.
- JOST, A. et COLONGE, R.A. 1949. - Greffe de testicule foetal de Rat sur l'adulte castré et hypophysectomisé. Remarques sur la physiologie du testicule foetal de Rat. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 143, 140.
- JOST, A. et GONSE P. 1953. - Application de la méthode à l'acide periodique - Schiff (Mac Manus) à l'étude histophysiologique de l'hypophyse foetale du Lapin. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, 42, 243.
- JOST, A. et JACQUOT, R. 1953. - Recherches sur la physiologie de l'hypophyse foetale de Lapin dans ses rapports avec le fonctionnement testiculaire. *J. Physiol.*, 45, 134 - 136.
- JOST, A. et MILLOT, M. 1953. - Homo - transplantation du placenta sur le Rat mâle. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 147, 1738.
- JOST, A. et TAVERNIER, R. 1956. - Application de la méthode à l'acide periodique Schiff (Mac Manus) à l'étude de l'hypophyse foetale du Rat. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 243, 1353.
- JOUAN, P. 1968. - Aspects récents de la physiologie et de la biochimie de la glande pinéale. *Path. Biol.*, 16, 93 ; *Pathol. Biol.*, 16, 209.
- KALLEN, B. 1958. - Studies in the differentiation capacity of neural epithelium cells in chick embryo. *Z. Zellforsch.*, 47, 469.
- KAPPERS J. ARIENS, 1960. - Epiphysis cerebri in the albino rat. *Z. Zellforsch.*, 52, 9.
- KAPPERS J. ARIENS, 1961. - Die Innervation der Epiphyse cerebri des Albinoratte. *Acta neuroveg.*, 23, 111.
- KAPPERS J. ARIENS, 1969. - The Mammalian Pineal Organ. *J. Neurovisc. Rel. suppl.* IX, 140.
- KERR, T. 1946. - The development of pituitary of the laboratory mouse. *Quart. J. micr. Sci.*, 87, 3 - 29.
- KINCL, F.A., PI, A.F. et LASSO, L.H. 1963. - Effects of estradiol benzoate treatment in the newborn male rat. *Endocrinology*, 72, 966 - 968.
- KINCL, F.A. et MAQUEO, M. 1966. - Débat après la conférence de C.A. Barraclough In : *Recent Progress in Hormone Research*, Laurentia Horm. Conference.
- KINCL, F.A. et BENAGIANO, G. 1967. - The failure of the pineal gland removal in neonatal animals to influence reproduction. *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 54, 184.
- KITAY, J.I. et ALTSCHULE, M.O. 1954. - The pineal gland. Harvard University Press, Cambridge.
- KOVACS, Y. 1960. - Cytophysiological studies on the Leydig cells of the mouse testis. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 11, 7 - 14.
- KRATOCHWIL, K. 1969. - Communication on Workshop on morphogenetic tissue interactions. Helsinki, September 1969.

- LERNER, A., CASE, J., TAKAHASHI, Y., LEE, T. et MORI, W. 1958. - Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. J. Amer. Chem. Soc., 80, 2587.
- LEVINA, S.E. 1965. - Morphology of the human hypophysis in embryogenesis. Arch. Anat. Histol. Embryol., URSS, 48, 78.
- LEVINA, S.E. 1968. - Endocrine feature in development of human hypothalamus, hypophysis and placenta. Gen. Comp. Endocr., 11, 151 - 159.
- LEVY, H., DEANE, H.N. et RUBIN, B.L. 1959. - Visualization of steroid 3 $\beta$  - ol - dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. Endocrinology, 65, 932 - 943.
- LIBMAN, E. 1953. - Recherche sur l'hypophyse de castration au cours du développement chez le Rat mâle. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 42, n°4, 281 - 318.
- LIBMAN, E. et JOST, A. 1953. - Recherches sur l'hypophyse de Rats mâles castrés à la naissance. Ann. Endocr. (Paris), 14, 673.
- LINDH, J. 1961. - Quantitative aspects of prenatal gonad growth in albino rat and golden hamster studied by morphologic and experimental methods. Thèse Lund.
- LOMBARD - DES GOUTTES, M.N. 1966 a. - Evolution pondérale des glandes endocrines et des glandes génitales annexes chez le Rat mâle de la naissance à la puberté. Ann. Endocr., (Paris), 27 n°2, 121 - 123.
- LOMBARD - DES GOUTTES, M.N. 1966 b. - Croissance pondérale de l'épiphyse comparée à celle des glandes endocrines au cours des premiers jours de la vie chez le Rat mâle. C. R. Soc. Biol. (Paris), 160, 1368 - 1362.
- LOMBARD - DES GOUTTES, M.N. 1967. - Quelques effets de l'épiphysectomie chez la Souris nouveau-né mâle. C. R. Acad. Sci. (Paris), 264, 2141.
- LOMBARD - DES GOUTTES, M.N. et GROBSTEIN, C. 1969. - Activity in various embryonic and post-embryonic sources for induction of kidney tubules. Develop. Biol., 19, 41 - 51.
- LOSTROH, A.J. 1960. - In vitro response of mouse testis to human chorionic gonadotropin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 103, 25.
- LOSTROH, A.J. 1969. - Regulation by FSH and ICSH (LH) of reproductive function in the immature male rat. Endocrinology, 85, 438.
- McMANUS, J.F.A. 1948. - Histochemical and histological uses of periodic acid. Stain Tech., 23, 99 - 108.
- McQUEEN - WILLIAMS, M. - A sex difference in cytology of the anterior hypophysis of the rat. Anat. Rec., 58, 78.
- MAEIR, D.M. 1965. - Species variation in testicular  $\Delta^5$ -3 $\beta$  -hydroxysteroid dehydrogenase activity : absence of activity in primate Leydig cells. Endocrinology, 76, 463 - 469.
- MAILLARD, M. 1963. - Origine des grains de sécrétion dans les cellules de l'antéhypophyse embryonnaire du Rat : rôle de l'appareil de Golgi. J. microsc. (Paris), 2, 81.
- MAQUEO, M., BURT, A. et KINCL, F.A. 1966. - Pituitary histology of rats treated neonatally with steroids hormones. Acta endocr., 53, 438 - 442.
- MAQUEO, M. et KINCL, F.A. 1964. - Testicular histo-morphology of young rats treated with oestradiol - 17 $\beta$  benzoate. Acta endocrinol., 46, 25 - 30.
- MARINETTI, G.V., ERBLAND, J. ALBRECHT, M. et ELMER STOTZ 1958. - Time study of incorporation in vivo of 32 P- orthophosphate into phosphatides of rat tissues. Biochem. Biophys. Acta, 30, 543.
- MARSHALL, A.J. 1949. - On the function of the interstitium of the testis. The sexual cycle of a wild bird Fulmaris glacialis. Quart. J. micr. Sci., 90, 265.
- MARTINEZ, C. et BITTNER, J.J. 1956. - A non - physiological sex difference in oestrous behaviour of mice bearing pituitary grafts. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 91, 506.
- MARTINOVITCH, P.N. 1937. - Development in vitro of the mammalian gonad. Nature, 139, 413.
- MARTINOVITCH, P.N. 1938. - The development in vitro of the mammalian gonad. Archiv. für exp. Zellforsch., 22, 74.
- MARTINOVITCH, P.N. 1954. - The cultivation of the pituitary of infantile rats by the glassrod technique and the influence of grafted explants on the growth of hypophysectomized hosts. J. embryol. exp. morphol., 2, part 1, 14-25.
- MARTINS, T. et de MELLO, R.F. 1935. - Pourcentage relatif des types cellulaires de l'hypophyse antérieure des rats normaux et des rats cryptorchides. C. R. Soc. Biol. (Paris), 118, 916 - 917.
- MATTHIES, D.L. 1968. - Studies of the luteotrophic and mammatrophic factor found in trophoblast and maternal peripheral blood of the rat at mid-pregnancy. Anat. Rec., 159, 55.
- MEANS, A.R. et HALL, P.F. 1967. - Effect of FSH on protein biosynthesis in the testis of the immature rat. Endocrinology, 81, 1151.

- MESS, B., FRASCHINI, F., PIVA, F. et MARTINI, L. 1966. - The pineal body and the control of LH secretion. *Excerpta Med.*, 3, 361.
- MEUNIER, J.M. et BOUSQUET, J. 1964. - Culture organotypique de fragments de testicules de Rat en milieu artificiel. *C.R. Soc. Biol. (Paris)*, 158, 1872.
- MIDGLEY, A.R. 1967. - Immunoassay of human gonadotropin hormones. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp. suppl.* n° 3-4, 413 - 423.
- MILLER, J.F.A.P. 1962. - Effects of neonatal thymectomy and the immunological responsiveness of the mouse. *Proc. Roy. Soc. B* 156, 415 - 428.
- MINTZ, B. 1957. - Embryological development of primordial germ cells in the mouse. Influence of a sex mutation. *J. embryol. exp. morphol.*, 5, 396 - 403.
- MINTZ, B. 1960. - Embryological phase of mammalian gamete genesis. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 56 suppl. 1, 31 - 48.
- MINTZ, B. et GALLIEN, L. 1951. - Etude comparative de l'action paradoxale (féminisation) du propionate de testostérone sur *Pleurodeles waltlii* Michah. normal et hypophysectomisé. *C. R. Soc. Biol.*, 145, 1793 - 1794.
- MINTZ, B. et GALLIEN, L. 1954. - Androgen induced feminization of urodele larvae in the absence of the hypophysis. *Anat. Rec.*, 119, 493 - 517.
- MISKEVITCH, M.S. et LEVINA, S.E. 1965. - Investigation on the structure and gonadotropic activity in embryogenesis of human pituitary. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, 54, 129.
- MONEY, W.L. et RAWSON, R.W. 1955. - Uptake of  $^{32}$ P by chick thyroid and testis following pituitary administration, iodine deficiency and thiouracil. *Amer. J. Physiol.*, 182, 1.
- MONNIER, R. 1940. - Les fonctions de la glande pinéale (étude critique et expérimentale). *Rev. Med. Suisse Rom.*, 60, 1178.
- MONNIER, R. et DEVRIENT, T. 1941. - Les effets d'implantations répétées de la glande pinéale bovine chez le jeune Rat. *C. R. Phys. Hist. Nat. (Genève)*, 58, 159.
- MOORE, C.R. et PRICE, D. 1938. - Some effects of testosterone and testosterone propionate in the rat. *Anat. Rec.*, 71, 59 - 78.
- MOREAU, N. 1964. - Contribution à l'étude de certaines corrélations endocriniennes de l'épiphyse. Thèse, Nancy.
- MOREL, F. 1968 - 69. - Mécanismes cellulaires d'action des hormones : rôle du deuxième messenger. Cours de Physiologie cellulaire, Collège de France (Paris).
- MOSZKOWSKA, A. 1951. - Action d'extraits aqueux de glandes pinéales de moutons sur les Souris mâles et femelles. Antagonisme épiphyso - hypophysaire. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 142, 847.
- MOSZKOWSKA, A. 1955. - L'antagonisme épiphyso - hypophysaire. *Rev. suisse de Zool.*, 62, 198 - 313.
- MOSZKOWSKA, A. 1956. - L'antagonisme épiphyso - hypophysaire. Etude in vitro par la méthode de E. Wolff. *C. R. Acad. Sci.*, 243, 315 - 317.
- MOSZKOWSKA, A. 1958. - Mise en évidence par les greffes sur l'ovaire de la Ratte impubère de l'antagonisme épiphyso - hypophysaire. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 246, 3685.
- MOSZKOWSKA, A. 1961. - Activité de l'antéhypophyse en culture organotypique. La fonction gonadotrope. Séminaire du Collège de France, Chaire d'Histophysiologie, n°1, *Biol. Méd.*, 56, 299 - 308.
- MOSZKOWSKA, A. 1963. - L'antagonisme épiphyso - hypophysaire. *Ann. Endocrin.*, 24, 215.
- MOSZKOWSKA, A. 1965. - Contribution à l'étude du mécanisme de l'antagonisme épiphyso - hypophysaire. *Progr. Brain. Res.*, 10, 654 - 676.
- MOSZKOWSKA, A. et SCEMAMA, A. 1968. - L'épiphysectomie et la réponse photosexuelle du Rat. *Arch. Anat. Histol. Embryol. norm. exp.*, 51, 475 - 479.
- MOSZKOWSKA, A. et EBELS, I. 1970. - Rôle modulateur de l'épiphyse sur la gonadostimulation hypophysaire. In : *Neuroendocrinologie*, éd. par J. Benoit et C. Kordon, CNRS, Paris, sous presse.
- NEUMANN, F. 1966. - Antagonismus von Testosteron und 1,2  $\alpha$  -Methylen - 6 - chloro - pregna - 4,6 - dien - 17  $\alpha$  ol, 3, 20 - dion (Cyproteron) an den die Gonadotropin - sekretion regulierenden Zentren bei männlichen Ratten. *Acta Endocr. (Kbh)*, 53, 382 - 390.
- NEUMANN, F. et ELGER, W. 1966. - Permanent change in gonadal function and sexual behaviour as a result of early feminization of male rats by treatment with an antiandrogenic steroid. *Endokrinologie*, 50, 209 - 225.
- NEUMANN, F., HAHN, J.D. et KRAMER, M. 1967. - Hemmung von testosteronabhängigen Differenzierungsvorgängen der männlichen Ratte nach der Geburt. *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 54, 227 - 240.

- NEUMANN, F., STEINBECK, H., ELGER, W. et von BERSWORDT - WALLRABE, R. 1968. - Hoden - Morphologie und Funktion unter der Einwirkung von PMS und HCG bei gleichzeitiger Antiandrogen - Behandlung. Acta Endocrinol. (Kbh), 57, 639 - 648.
- NEWTON, W.H. et BECK, N. 1939. - Placental activity in the mouse in the absence of the pituitary gland. J. Endocrinol., 1, 65.
- NIEMI, M. et IKONEN, M. 1961. - Steroid -  $3\beta$  -ol dehydrogenase activity in foetal Leydig's cells. Nature, 189, 592.
- NIEMI, M. et IKONEN, M. 1962. - Cytochemistry of oxidative enzyme systems in the Leydig cells of the rat testis and their functional significance. Endocrinology, 70, 167 - 174.
- NIEMI, M. et IKONEN, M. 1963. - Histochemistry of the Leydig cells in the postnatal prepubertal testis of the rat. Endocrinology, 72, 443 - 448.
- NIEMI, M. et KORMANO, M. 1964. - Cell renewal in the interstitial tissue of postnatal prepuberal rat testis. Endocrinology, 74, 996 - 998.
- NIKITOVITCH, M. et KNOBIL, E. 1965. - Placental transfer of thyreotropic hormone in the rat. J. clin. Endocrinol., 2, 322.
- NOUMURA, T., WEISZ, J. et LLYOD, C.W. 1966. - In vitro conversion of 7 -  $3H$  - progesterone to androgens by the rat testis during the second half of fetal life. Endocrinology, 78, 245 - 253.
- ORTAVANT, R. et COUROT, M. 1967. - Action des hormones gonadotropes sur la lignée germinale mâle adulte. Arch. Anat. micr; Morphol. exp., 56, suppl. 3 - 4, 11 - 124.
- OWMAN, C. 1961. - Secretory activity of the fetal pineal gland of the rat. Acta morphol. neerl. Scand., 3, 367.
- OWMAN, C. 1964 a. - New aspects of the mammalian pineal gland. Acta physiol. Scand., 63 suppl., 240, 1 - 39.
- OWMAN, C. 1964 b. - Further studies on prenatal functional relations between rat pineal gland and epithelium of lower ileum. Acta endocrinol. (Kbh), 47, 500 - 516.
- OWMAN, C. et LOMBARD - DES GOUTTES, M.N. 1967. - non publié.
- PANNABECKER, R. et PRICE, D. 1960. - Detection of androgenic hormone by means of a bio - indicator method. Anat. Rec., 136, 343.
- PARLOW, A.F. 1958. - A rapid bioassay for LH and factors stimulating LH secretion. Fed. Proc., 17, 402.
- PASTEELS, J.L. 1963. - Recherches morphologiques et expérimentales sur la sécrétions de prolactine. Extr. Arch. Biol., A.S.B.L. 74, 439 - 554.
- PAVLOVA, E.B. 1966. - The functional cytology of the adenohypophysis of human fetus. In : "Development of Endocrine functions during Fetal Life" Nauka. Moscow, 156.
- PEARSE, A.G.E. 1960. - Histochemistry. Theoretical and applied. Churchill Ltd. London, 538 - 545.
- PELLETIER, J. 1967. - Les méthodes biologiques de dosage de FSH et de LH. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 56 suppl. 3 - 4, 390 - 400.
- PESONEN, S. et RAPOLA, J. 1962. - Observations on the metabolism of adrenal and gonadal steroid in *Xenopus laevis* and *Bufo bufo*. Gen. Comp. Endocr., 2, 425 - 432.
- PETERSON, et YOUNG 1952. - The problem of placental permeability for thyrotropin, propylthiouracyl and thyroxine in the guinea pig. Endocrinology, 50, 218 - 225.
- PETROVIC, A. 1961. - Recherches sur la préhypophyse en culture organotypique : évolution structurale et action sur les organes effecteurs associés in vitro. Thèse Sciences, Strasbourg.
- PFEIFFER, C.A. 1936. - Sexual differences of the hypophyses and their determination by the gonads. Amer. J. Anat., 58, 195.
- PICON, R. 1967. - Activité  $\Delta^5$  -  $3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase du testicule foetal de Rat in vitro. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 56, 281 - 290.
- PICON, R. et OTTOWIEZ, J. 1967. - Recherches histochimiques sur le testicule du foetus de Rat normal ou décapité. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 56, 1 - 10.
- POUREAU - SCHNEIDER, N. 1970. - Action d'une tumeur de la glande interstitielle du testicule sur la prostate ventrale du Rat en culture organotypique. C. R. Acad. Sci. (Paris), 270, 242 - 244.
- PRICE, D. 1936. - Normal development of the prostate and seminal vesicles of the rat with a study of experimental post - natal modification. Amer. J. Anat., 60, 79 - 127.
- PRICE, D. et ORTIZ, E. 1944. - The relation of age to reactivity in the reproductive system of the rat. Endocrinology, 34, 215 - 239.
- PRICE, D. et PANNABECKER, R. 1956. - Organ culture studies of fetal rat reproductive tracts. In : Ciba Foundation Colloquia on Ageing, 2, 3 - 13.

- PURVES, H.H. et GRIESBACH, W.E. 1951. - The significance of the Gomori staining of the basophils of the rat pituitary. *Endocrinology*, 49, 652.
- QUAY, W.B. 1963 a. - Circadian and estrous rhythms in pineal melatonin and 5 - hydroxyindole - 3 - acetic acid. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N.Y., 115, 710.
- QUAY, W.B. 1963 b. - Circadian rhythm in rat pineal serotonin and its modification by estrous cycle and photoperiod. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 3, 473.
- QUAY, W.B. et LEVINE, B.E. 1957. - Pineal growth and mitotic activity in the rat and the effects of colchicine and sex hormones. *Anat. Rec.*, 129, 65 - 77.
- QUAY, W.B. et HALEVY, A.L. 1962. - Experimental modification of the rat pineal's content of serotonin and related indole amines. *Physiol. Zool.*, Chicago, 35.
- RAMIREZ, V.D. et McCANN, S.M. 1963. - Comparison of the regulation of luteinizing hormone ( LH ) secretion in immature and adult rats. *Endocrinology*, 72, 452 - 464.
- RAUGH, W. 1925. - Ursprung der männlichen Keimzellen und die chromatischen Vorgänge bis zur Entwicklung der Spermatozyten. *Z. Anat. Entwickl.*, 76, 561 - 577.
- RAUGH, W. 1929. - Das Chondriom in den ersten Keimzellen der Ratte. Eine Keimbahn untersuchung. *Z. Gen. Anat.*, 89, 271 - 309.
- RAYNAUD, A. 1942. - Recherches embryologiques et histologiques sur la différenciation sexuelle normale de la Souris. *Bull. Biol. Fr. et Belg.*, suppl. 29, 1 - 114.
- RAYNAUD, A. 1947. - Effet des injections d'hormones sexuelles à la Souris gravide sur le développement des ébauches de la glande mammaire de l'embryon. I. - Action de substances androgènes. *Ann. Endocrinol.*, 8, 248 - 253.
- RAYNAUD, A. 1947. - Observations sur le développement de la glande mammaire des foetus mâle et femelle de Souris. *Ann. Endocrinol.*, 8, 349 - 358.
- RAYNAUD, A. et FRILLEY, M. 1947. - Développement intra - utérin des embryons de Souris dont les ébauches de l'hypophyse ont été détruites, au moyen des rayons X, au 13e jour de la gestation. I. Développement de l'appareil génital. *C. R. Acad. Sci. ( Paris )*, 225, 596 - 598.
- RAYNAUD, A. et FRILLEY, M. 1949. - Structure histologique des testicules des foetus de Souris dont l'hypophyse a été détruite au moyen des rayons X. *C. R. Soc. Biol. ( Paris )*, 143, 954.
- RAYNAUD, A. et FRILLEY, M. 1950. - Développement des canaux de Muller chez des foetus mâles de Souris dont les testicules ont été irradiés, au moyen des rayons X, à l'âge de 14 jours. *Ann. Endocrinol.*, 11, 32 - 48.
- RAYNAUD, A., RAYNAUD, J., COLLENOT, G. et COLLENOT, A. 1967. - Sur les effets précoces de l'oestradiol chez le jeune embryon de Lézard vert ( *Lacerta viridis* Laur. ). *C. R. Acad. Sci. ( Paris )*, 265, 1729 - 1732.
- REISS, M., DAVIS, D., LIDEMAN, M. MANER, I. et PLICHTA, E. 1963. - Action of pineal extracts on the gonads and their function. *J. Endocr.*, 27, 107.
- REITER, R.J., HOFFMAN, J.C. and RUBIN, P.H. 1968. - Pineal gland: influence on gonads of male rats treated with androgen three days after birth. *Science*, 160, 420.
- RIVIERE, M.R. 1962. - Observations non publiées.
- ROMEIS, B. 1940. - Hypophyse. In: "Handbuch der mikrosk. Anat. des Menschen" 6, Chap. 3, Springer Verlag ( Berlin ).
- ROOSENRUNGE, E.C. et ANDERSON, D. 1959. - Development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anat.*, 37, 125 - 137.
- ROOSENRUNGE, E.C. et LEIK, J. 1968. - Gonocyte degeneration in the postnatal male Rat. *Amer. J. Anat.*, 122, 275.
- RUBASCHKIN, W. 1912. - Zur Lehre von der Keimbahn bei Säugetieren. Ueber die Entwicklung der Keimdrüsen. *Anat. Hefte*, 46, 345 - 411.
- RUBIN, B.L., DEANE, H.W. et HAMILTON, J.A. 1963. - Biochemical and histochemical studies on  $\Delta^4$  - 3 $\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase activity in the adrenal glands and ovaries of diverse mammals. *Endocrinology*, 73, 748 - 763.
- SALZGEBER, B. 1963. - Modification expérimentale du développement de l'ovaire de Souris sous l'influence du testicule embryonnaire de Poulet. *J. Embryol. exp. Morph. II. part I*, 91 - 105.
- SAMUELS, L., HELMREICH, M.L., LASATER, M. et REICH, M. 1951. - An enzyme in endocrine tissues which oxidises  $\Delta^4$  - 3 $\beta$  - hydroxysteroids to  $\Delta^4$  - unsaturated ketones. *Science*, 113, 490.
- SANO, M. et SASAKI, F. 1969. - Embryologic development of the mouse anterior pituitary studied by light and electron microscopy. *Z. Anat. Entwickl.*, 129, 195 - 222.
- SAPSFORD, C.S. 1962. - Changes in the cells of the sex cords and seminiferous tubules during the development of the testis of the rat. *Austral. J. Zool.*, 10, 178.

- SAXEN, L., VAINIO, T. et TOIVONEN, S. 1962. - Effect of polyoma virus on mouse kidney rudiment in vitro. J. Nat. Cancer Inst., 22, 597 - 631.
- SCHEIB, D. 1970. - Sur la présence de cellules "interstitielles primaires" dans les cordons du testicule de l'embryon de Poulet. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 270, 123 - 125.
- SCHEIB, D. et HAFFEN, K. 1967. - Etude histochimique de la  $3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase de jeunes gonades embryonnaires de Poulet. C. R. Acad. Sci. ( Paris ), 264, 161 - 164.
- SCHEIB, D. et HAFFEN, K. 1968. - Sur la localisation histoenzymologique de la  $3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase dans les gonades de l'embryon de Poulet : apparition et spécificité de l'activité enzymatique. Ann. Embryol. Morphol., 1, 61 - 72.
- SCHEIB, D. et HAFFEN, K. 1969. - Apparition et localisation des hydroxystéroïdes déshydrogénase (  $\Delta^5 3\beta$  et  $17\beta$  ) dans les gonades de l'embryon et du poussin de la Caille ( Coturnix coturnix japonica ). Etude histoenzymologique et comparaisons avec le poulet ( Gallus gallus domesticus ). Gen. Comp. Endocr., 12, 586 - 597.
- SCHEIB, D. et LOMBARD, M.N. 1970. - Etude histoenzymologique de l'activité de la  $\Delta^5 3\beta$  - hydroxystéroïde déshydrogénase du testicule de Souris avant et après la naissance; testicule normal et testicule explanté en présence d'hypophyse. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., sous presse.
- SEEPOVIC, M. 1963. - Contribution à l'étude histophysiologique de la glande thyroïde chez les rats épiphysectomisés. Ann. Endocrinol. ( Paris ), 24, 371.
- SEEPOVIC, M. et SCHIPPERS, M. 1965. - Effetti del' epifisectomia su alcune attivita enzimatiche della tiroide in Epimys norvegicus albinus. Arch. ital. ant. embryol., 70, 49 - 60.
- SEGAL, J.J. et JOHNSON, D.C. 1959. - Inductive influence of steroid hormone on the neural system : ovulation controlling mechanism. Arch. Anat. micr. suppl. 48, 261.
- SIMKINS, C.S. 1923. - On the origin and migration of the so-called primordial germ cells in the mouse and the rat. Acta Zool. ( Stockholm ), 4, 241.
- SIMONET, H. et THIEBLOT, L. 1950. - Action de l'épiphyse sur différentes glandes endocrines. J. Physiol. ( Paris ), 42, 726.
- SIPERSTEIN, E.R. 1955. - Cytological changes in anterior pituitary from birth to maturity. Anat. Rec., 118, 593.
- SLUITER, J.W. 1943. - Experimentelle Untersuchung über die Funktion des Interstitiums der Gonade. I. Versuche an männlichen und weiblichen juvenilen Mäusen. Z. Zellforsch. B, 33, 311 - 335.
- SMITH, P.E. et DORTZBACH, C. 1929. - The first appearance in the anterior pituitary of the developing pig fetus of detectable amounts of the hormone stimulating ovarian maturity and general body growth. Anat. Rec., 43, 277.
- SOFFER, I., FOGEL, M. et RUDAVSKY, A. 1965. - The presence of a gonadotrophin inhibiting substance in pineal gland extracts. Acta Endocr. ( Kbh ), 48, 561.
- STEELMAN, S.L. et POHLEY, F.P. 1953. - Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotrophin. Endocrinology, 53, 604 - 616.
- STEINBERGER, E. et DUCKET, G.E. 1965. - Effect of estrogen or testosterone on initiation and maintenance of spermatogenesis in the rat. Endocrinology, 76, 1184 - 1189.
- STEINBERGER, E., STEINBERGER, A. et PERLOFF, W.H. 1964. - Initiation of spermatogenesis in vitro. Endocrinology, 74, 788 - 792.
- STEINBERGER, A. et STEINBERGER, E. 1966. - Stimulatory effect of vitamins and glutamine on the differentiation of germ cells in the rat testes organ culture grown in chemically defined media. Exp. Cell. Res., 44, 429.
- STEINBERGER, E., STEINBERGER, A. et VILAR, O. 1966. - Cytochemical study of  $\Delta^5 3\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase in testicular cells grown in vitro. Endocrinology, 79, 406 - 410.
- TATA, J.R. 1968. - Hormonal regulation of growth and protein synthesis. Nature, 219, 331.
- THIEBLOT, L. et LE BARS, H. 1955. - La glande pinéale. ( Maloine, éd. Paris ).
- THIEBLOT, L. ALASSIMONE, A. et BLAISE, S. 1967. - Etude chromatographique et électrophorétique du facteur anti-gonadotrope de la glande pinéale. Ann. Endocr. ( Paris ), 27, 861.
- THIEBLOT, L. et BLAISE, S. 1963. - Influence de la glande pinéale sur les gonades. Ann. Endocr. ( Paris ), 24, 270.
- TIXIER - VIDAL, A. 1958. - Etude histophysiologique des relations hypophyse et thyroïde chez l'embryon de Poulet. Arch. Anat. micr. Morphol. exp., 47, 235 - 340.
- TIXIER - VIDAL, A. et GOURDJI, D. 1970. - Synthesis and renewal of proteins in duck anterior hypophysis in organ culture. J. Cell. Biol., sous presse.
- TORREY, T.W. 1945. - The development of the urinogenital system of the albino rat. II. : The gonads. Amer. J. Anat., 76, 375.
- WATTENBERG, L.W. 1958. - Microscopic histochemical demonstration of steroid  $3\beta$  ol - dehydrogenase in tissue reactions. J. Histochem. Cytochem., 6, 225 - 232.
- WATSON, J.D. 1968. - Biologie moléculaire du gène. Ed. française dirigée par F. Gros, Paris.

- WELLS, L. J. 1946. - Effects of injections of equine gonadotrophin upon the gonads and adrenals of fetal rats. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 62, 250 - 254.
- WELLS, L. J. 1947. - Progress of studies designed to determine whether the fetal hypophysis produces hormones that influence development. *Anat. Rec.*, 97, 409.
- WELLS, L. J. 1948. - Some experimental evidence of production of adrenotrophin by the fetal hypophysis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 68, 487.
- WELLS, L. J. 1950. - Hormones and sexual differentiation in placental Mammals. *Arch. Anat. micr. Morphol. exp.*, 39, 499.
- WELLS, L. J. et FRALICK, R. L. 1951. - Production of androgen by the testes of fetal rats. *Amer. J. Anat.*, 89, 63-107.
- WENIGER, J. P. 1964. - Régression du canal de Müller d'embryon de Souris mâle soumis à l'action de l'hormone testiculaire. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 259, 1899 - 1901.
- WENIGER, J. P., ERHARDT, J. D. et FRITTTIG, B. 1967. - Sécrétion de testostérone et d'androsténédione par les testicules embryonnaires de Souris cultivés in vitro. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 264, 1069 - 1071.
- WIDMAIER, R. 1963. - Ueber die postnatale Hodenentwicklung und Keimzellreifung ber der Maus. *Z. mikr. anat. Forsch.*, 70, 215.
- WIENER, H. 1968. - External chemical messengers. V: More functions of the pineal gland. *N.Y. State J. Med.*, 68, 1019.
- WIESNER, B. P. 1935. - The postnatal development of the genital organs in the albino rat. *J. Obst. Gynecol.*, *British*, 41, 867, 42, 8.
- WILLIERS, B. H. 1939. - The embryonic development of sex. In : *Sex and internal secretions*. Ed by Allen (Baillière, Tindall et Cox, London), 64 - 144.
- WILLIERS, B. H. 1955. - Ontogeny of endocrine correlations. In : *Analysis of the development*. Willier, Weiss et Hamburger, éd. by Saunders Co, Philadelphia and London, 574 - 619.
- WISLOCKI, G. B. 1937. - The meningeal relations of the hypophysis cerebri : An embryological study of the meninges and blood vessels of the human hypophysis. *Amer. J. Anat.*, 61, 95 - 129.
- WISLOCKI, G. B., WEISS, L. P., BURGOS, M. H. et ELLIS, R. A. 1957. - Cytology, histochemistry and electron microscopy of the granular cells of the metrial gland of the gravid rat. *J. Anat.*, 91, 130 - 140.
- WITSCHI, E. 1948. - Migration of the germ cells of human embryos from the yolk - sac to the primitive gonadal folds. *Carnegie Inst. Wash. Publi. n° 575 contrib. Embryol.* 32, 67 - 80.
- WOLFF, E. 1952. - Sur la différenciation sexuelle des gonades de Souris explantées in vitro. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 234, 1712 - 1714.
- WOLFF, E. 1964. - Problèmes généraux et problème spécial de la différenciation sexuelle. *Ann. Fac. Sci.*, 26, 17 - 25.
- WOLFF, E. 1968. - Specific interactions between tissues during organogenesis. *Develop. Biol.*, 3, 65 - 93.
- WOLFF, E. et HAFFEN, K. 1952. - Sur une méthode de culture d'organes embryonnaires in vitro. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 10, 463 - 472.
- WOLFF, E; et HAFFEN, K. 1952. - Sur une technique permettant la culture in vitro des gonades embryonnaires des Oiseaux. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 234, 1396 - 1398.
- WOLFF, E. et WENIGER, J. P. 1953. - Sur les associations xénoplastiques de gonades embryonnaires de Canard et de Souris en culture in vitro. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 237, 946.
- WOLFF, E. et WENIGER, J. P. 1954. - Recherches préliminaires sur les chimères d'organes embryonnaires d'Oiseaux et de Mammifères en culture in vitro. *J. embryol. exp. Morphol.*, 2, 161.
- WOLFF, E. et WOLFF, E. 1952. - Le déterminisme de la différenciation sexuelle de la syrinx de canard cultivée "in vitro". *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 86, 325 - 350.
- WRAGG, L. E. 1967. - Effects of pinealectomy in the newborn female rat. *Amer. J. Anat.*, 120, 391.
- WURTMAN, R., ALTSCHULE, M. et HOLMGREN, U. 1959. - Effect of pinealectomy and of a bovine pineal extract in rat. *Amer. J. Physiol.*, 197, 108.
- WURTMAN, R., AXELROD, J. et CHU, E. W. 1963. - Melatonin, a pineal substance : effect on the rat ovary. *Science*, 141, 277.
- YASUO YOKOE, MEANS, A. R. et HALL, P. 1969. - The influence of FSH on testicular phospholipids. *Biochem. Biophys. acta*, 187, 278.
- YOKOE, Y. et HALL, P. F. 1970. - Testicular phospholipids : I. Action of follicle stimulation hormone (FSH) upon the biosynthesis of phospholipids by rat testis. *Endocrinology*, 86, 18.
- ZWEIG, M. SNYDER, S. H. et AXELROD, J. 1966. - Evidence for a non retinal pathway of light to the pineal gland of newborn rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, 56, 515 - 520.

## DEUXIÈME THÈSE

---

Propositions données par la Faculté

Vu et approuvé

Paris, le ... 1er Juillet ... 19... 70

Le Doyen de la Faculté des Sciences  
de Paris

Marc. ZAMANSKY

Vu  
et permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

Robert MALLET





